

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»  
Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра біоінформатики**

«На правах рукопису»  
УДК \_\_\_\_\_

До захисту допущено:  
Завідувач кафедри  
\_\_\_\_\_ Світлана, ГОРОБЕЦЬ  
«\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р.

**Магістерська дисертація  
на здобуття ступеня магістра  
за освітньо-професійною програмою ««Біотехнології»  
зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
на тему: «Вплив сорбції пробіотичних культур на  
високодисперсному кремнеземі на функціональні властивості  
заквашувального препарату»**

Виконала:

студентка VI курсу, групи БМ-91мп  
Киселюк Дарія Олегівна \_\_\_\_\_

Науковий керівник:

доц. каф. біоінформатики, к.т.н., с.н.с.  
Маринченко Лоліта Вікторівна \_\_\_\_\_

Консультант з експериментальної частини:

зав. від. біотех. Інст. прод. ресурсів НААН України  
д.т.н., с.н.с. Даниленко Світлана Григорівна \_\_\_\_\_

Консультант з розробки стартап проекту:

к.е.н., доц. Ткаченко Тетяна Петрівна \_\_\_\_\_

Рецензент:

доц. каф. прикл. екології, технол. полім.  
та хім. волокон КНУТД, к.т.н.  
Іщенко Олена Володимирівна \_\_\_\_\_

Засвідчую, що у цій магістерській дисертації  
немає запозичень з праць інших авторів без  
відповідних посилань.

Студентка \_\_\_\_\_

Київ – 2020 року

**Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»**

**Факультет біотехнології і біотехніки**

**Кафедра біоінформатики**

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»:

Освітньо-професійна програма «Біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

\_\_\_\_\_ Світлана ГОРОБЕЦЬ

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 р.

**ЗАВДАННЯ**

**на магістерську дисертацію студенту**

**Киселюк Дарії Олегівні**

1. Тема дисертації «Вплив сорбції пробіотичних культур на високодисперсному кремнеземі на функціональні властивості заквашувального препарату», науковий керівник дисертації МаринченкоЛоліта Вікторівна, к.т.н., с.н.с., затверджені наказом по університету від «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ р. № \_\_\_\_\_

2. Термін подання студентом дисертації \_\_\_\_\_

3. Об'єкт дослідження – пробіотичні мікроорганізми: *Bifidobacteriumlongum*, *Streptococcusthermophilus*, *Lactobacillusdelbrueckii*subsp. *bulgaricus*; високодисперсний кремнезем: Ентеросгель, Силлард П (Силікс), Токсин.NET.

4. Предмет дослідження – закономірності іммобілізованої на кремнеземових сорбентах заквашувальної культури (захисні, біотехнологічні та реологічні характеристики, вплив магнітного поля).

5. Перелік завдань, які потрібно розробити: дослідити показники виживаності іммобілізованих пробіотичних препаратів на різних типах сорбентів

(порошкоподібному та гідрогелевому), дослідити реологічні показники молока, сквашеного іммобілізованою та нативною культурою *S.thermophilus*, визначити біотехнологічні властивості кисломолочного продукту, сквашеного іммобілізованою та неіммобілізованою культурою *S.thermophilus*, дослідити вплив магнітного поля на розподіл пробіотичних культур (коків і паличок) на кремнієвій поверхні методом фрактального аналізу отриманих зображень, розробити стартап-проект за темою дослідження.

6. Орієнтовний перелік графічного (ілюстративного) матеріалу: презентація

7. Орієнтовний перелік публікацій:

1. Киселюк, Д.О., Маринченко, М.О., Даниленко, С.Г. «Проблеми сумісного використання пробіотиків та ентеросорбентів. *Матеріали XIV всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження.* Київ, 2020. 41.

Danylenko, S., Romanchuk, I., Marynchenko., L., Kryzhska, T., Nizhelska, O., Potemsk, O., Khonkiv, M., Kyseliuk, D. "Immobilization of probiotic cultures with enterosorbents based on highly dispersed silica" *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, n.d.

8. Консультанти розділів дисертації\*

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Експериментальна частина	Даниленко Світлана Григорівна, зав. від. біотех. Інститут продовольчих ресурсів НААН України, д.т.н., с.н.с.		

---

\*Якщо визначені консультанти. Консультантом не може бути зазначено наукового керівника магістерської дисертації.

Розробка стартап- проєкту	Ткаченко Тетяна Петрівна, к.е.н., доцент		

9. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_

#### Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів магістерської дисертації	Примітка
1	Визначення предмету дослідження		
2	Характеристика об'єкту дослідження		
3	Огляд літератури		
4	Визначення матеріалів і методів дослідження		
5	Виконання експериментальної частини		
6	Аналіз отриманих результатів		
7	Розробка стартап-проєкту		
8	Оформлення магістерської дисертації		

Студентка

Дарія КИСЕЛЮК

Науковий керівник дисертації

Лоліта МАРИНЧЕНКО

## РЕФЕРАТ

Магістерська дисертація містить 100 сторінок, 29 таблиць, 20 рисунків, перелік посилань з 74 найменувань.

Мета дослідження – дослідити можливості створення заквашувального препарату на основі іммобілізації пробіотичних культур на зразках сухого високодисперсного кремнезему та гідрогелі метилкремнієвої кислоти.

Об'єкт дослідження – пробіотичні мікроорганізми: *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*; високодисперсний кремнезем.

Предмет дослідження – закономірності іммобілізованої на кремнеземовій матриці заквашувальної культури (захисні, біотехнологічні та реологічні характеристики, вплив магнітного поля).

Методи дослідження: мікробіологічні, реологічні, біотехнологічні, статистичні, фрактальний аналіз мікрозображень.

У роботі було досліджено виживаність *B. longum* та *S. thermophilus*, іммобілізованих на високодисперсному кремнеземі та ліофільно висушених, виживаність у модельованих умовах верхніх відділів шлунково-кишкового тракту; біотехнологічні та реологічні властивості кисломолочного продукту, сквашеного іммобілізованою культурою *S. thermophilus*; вплив магнітного поля на взаємодію іммобілізованих та неіммобілізованих пробіотичних штамів *S. thermophilus* та *L. bulgaricus* з кремнієвою пластиною шляхом проведення фрактального аналізу отриманих мікрозображень. Визначено придатність іммобілізованих пробіотичних штамів до використання у харчовій промисловості як заквашувальних препаратів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: КРЕМНЕЗЕМ, ПРОБІОТИКИ, ВИЖИВАНІСТЬ, КИСЛОМОЛОЧНИЙ ПРОДУКТ, РЕОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ, БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ, ВПЛИВ МАГНІТНОГО ПОЛЯ, ФРАКТАЛЬНИЙ АНАЛІЗ

## ABSTRACT

The master's thesis contains 100 pages, 29 tables, 20 figures, 74 references.

The purpose of this study was to investigate the possibilities of sorption of probiotic cultures on samples of dry highly dispersed silica and methyl silicic acid hydrogels and assessment of their functional state.

The objects of this study are probiotic microorganisms: *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*; highly-dispersed silica.

The subjects of the study are regularities of probiotic culture immobilization on silica (protective, biotechnological and rheological characteristics, magnetic field effect).

Research methods: microbiological, rheological, biotechnological, statistical, fractal analysis of microimages.

The survival of *Bifidobacterium longum* and *Streptococcus thermophilus* in the process of lyophilic drying and simulated conditions of the upper gastrointestinal tract was studied; biotechnological and rheological properties of fermented milk product fermented by immobilized culture of *Streptococcus thermophilus*; indirect effect of magnetic field on probiotic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* by fractal analysis. The suitability of immobilized probiotic strains for use in the food industry as yeast preparations is determined.

KEYWORDS: SILICA, PROBIOTICS, SURVIVAL, DAIRY PRODUCTS, RHEOLOGICAL PARAMETERS, BIOTECHNOLOGICAL PARAMETERS, MAGNETIC FIELD INFLUENCE, FRACTAL ANALYSIS

## ЗМІСТ

ВСТУП .....	10
1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	13
1.1 Пробіотичні штами .....	13
1.2 Відомі терапевтичні ефекти пробіотичних препаратів .....	15
1.3 Інкапсулювання пробіотичних клітин у різноманітні матриці .....	16
1.4 Кремнеземові сорбенти та їх класифікація .....	18
1.5 Властивості відомих ентеросорбентів на основі кремнеземів .....	21
1.6 Механізм взаємодії кремнеземових сорбентів із біологічними об'єктами .....	22
1.7 Модифікації кремнеземів .....	25
1.8 Взаємодія пробіотиків та сорбентів на основі кремнезему .....	27
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА .....	29
2.1 Матеріали та методи .....	29
2.1.1 Матеріали .....	29
2.1.2 Методи досліджень .....	32
3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....	45
3.1 Вплив іммобілізації пробіотичних культур <i>B. longum</i> і <i>S. thermophilus</i> на їх виживаність .....	45

3.3 Вплив модельованих кислих умов шлунково-кишкового тракту на виживаність комплексних препаратів пробіотичних штамів .....	48
3.4 Вплив тривалого зберігання за низьких температур на виживаність клітин у складі препарату .....	49
3.4 Визначення реологічних та біотехнологічних показників кисломолочного продукту, сквашеного комплексною заквашувальню пробіотичною культурою	51
3.5 Фрактальний аналіз зображень, отриманих після дії МП на суспензії пробіотичних культур .....	55
3.6 Перевірка потенційної можливості штамів до синтезу БМН методами порівняльної протеоміки .....	63
4 РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЄКТУ .....	64
4.1 Резюме стартап-проєкту .....	64
4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовищ стартапу та ключові фактори його успіху .....	67
4.3. Визначення ключових факторів успіху проєкту.....	72
4.4. Визначення потенційних споживачів .....	74
4.5 Оцінка ринкових позицій інноваційної розробки.....	76
4.6 Оцінка ризиків та страхування розробки .....	84
ВИСНОВКИ.....	88
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ .....	90



## ПЕРЕЛІК УМОВНИК СКОРОЧЕНЬ

FDA – Food and Drug Administration, Управління з контролю за продуктами та ліками

SCFA – short-chainfattyacids, жирні кислоти із коротким ланцюгом

БМН – біогенні магнітні наночастинки

ВДК – високодисперсний кремнезем

ГМ – гідролізат молока

КУО – колонієутворювальні одиниці

МКМ – мезопористі кремнеземні матеріали

МП – магнітне поле

МРС (MRS) – середовище de Man, Rogosa, Sharp

НВЧ – надвисокочастотне випромінювання

СДЛ, DDS – система доставки ліків (DrugDeliverySystem)

ШКТ – шлунково-кишковий тракт

ВООЗ – Всесвітня Організація Охорони Здоров'я

## ВСТУП

Необхідність захисту пробіотичних культур від дії зовнішнього середовища у процесі виготовлення, зберігання препарату, а також його проходження через шлунково-кишковий тракт була доведена закордонними дослідниками (Dianawati 2014, Haffner 2016, Semyonov 2012, Wang, et al. 2015). Для такого захисту використовуються різноманітні матриці, серед яких перспективним є кремнеземові, завдяки високій біосумісності та ємності (Геращенко 2009). Однак досі залишаються відкритими ряд питань щодо можливості створення та ефективності таких комплексних пробіотичних препаратів: типу кремнезему, його модифікацій, збережуваності таких комплексів у процесах ліофільного висушування, проходження через шлунково-кишковий тракт, впливу іммобілізації на характеристики кисломолочних продуктів тощо. Саме тому дослідження різних аспектів взаємодії кремнезему із пробіотичними культурами та вплив їх іммобілізації на функціональність є **актуальною задачею**. Вивчення впливу магнітних полів на сорбцію клітин на кремнієвій поверхні дасть змогу краще зрозуміти процес і механізм взаємодії. Створення комплексних препаратів пробіотичних культур з відомими і дозволеними у застосуванні ентерально високодисперсних кремнеземів може бути перспективним для використання цих комплексів як заквасок у харчовій промисловості.

**Мета роботи** – дослідження можливостей сорбції пробіотичних культур на зразках сухого високодисперсного кремнезему та гідрогелі метилкремнієвої кислоти та оцінка їх функціонального стану.

### **Завдання:**

1. Дослідити показники виживаності іммобілізованих пробіотичних препаратів на різних типах сорбентів (порошкоподібному та гідрогелевому) за умов ліофільної сушки, тривалого зберігання за низьких температур та модельованих умов верхніх відділів шлунково-кишкового тракту.

2. Визначити біотехнологічні та реологічні властивості кисломолочного продукту, сквашеного іммобілізованою культурою *S.thermophilus*.
3. Дослідити вплив МП на взаємодію іммобілізованих пробіотичних культур (коків і паличок) з кремнієвою поверхнею методом фрактального аналізу отриманих зображень.
4. Розробити стартап-проект за темою дослідження.

**Об'єкт дослідження:**

- пробіотичні мікроорганізми: *Bifidobacteriumlongum*, *Streptococcusthermophilus*, *Lactobacillusdelbrueckii*subsp. *bulgaricus*;
- високодисперсний кремнезем: Ентеросгель, Силлард П (Силікс), Токсин.NET.

**Предмет дослідження** – закономірності іммобілізованої на кремнеземовій матриці заквашувальної культури (захисні, біотехнологічні та реологічні характеристики, вплив машгітного поля).

**Методи досліджень:**

- мікробіологічні;
- реологічні;
- біотехнологічні;
- статистичні;
- фрактальний аналіз мікрозображень.

**Наукова новизна:**

1. Вперше визначено вплив закваски, створеної на основі іммобілізованої на ВДК культури *S. thermophilus* на захисні, біотехнологічні та реологічні параметри кисломолочного продукту.
2. Вперше методом фрактального аналізу показано вплив статичного магнітного поля індукцією 0,17 Тл на утворення структур неіммобілізованими пробіотичними культурами на пластинах "сонячного" кремнію.

**Практичне значення:** отримані результати демонструють можливість створення ефективного заквашувального препарату на основі іммобілізованих на високодисперсному кремнеземі пробіотичних культур

**Апробація:**

- **Киселюк, Д.О.,** Маринченко, М.О., Даниленко, С.Г. «Проблеми сумісного використання пробіотиків та ентеросорбентів. *Матеріали XIV всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» присвяченої 135-річчю від дня народження.* Київ, 2020. 41.
2. Danylenko, S., Romanchuk, I., Marynchenko, L., Kryzhska, T., Nizhelska, O., Potemka, O., Khonkiv, M., **Kyseliuk, D.** "Immobilization of probiotic cultures with enterosorbents based on highly dispersed silica." *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sc* (робота виконувалась в 2020 р. в рамках пошукової теми "Пошук сорбентів для іммобілізації клітин лактобактерій" ІПР НААН; стаття знаходиться на рецензуванні з травня 2019 р., журнал входить до наукометричної бази Scopus).

## 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1 Пробіотичні штами

Заданими Продовольчої та сільськогосподарської організації (ПСО,FAO) та Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), термін «пробіотики» означає «живі мікроорганізми, які при введенні в достатніх кількостях приносять користь для здоров'я організму господаря» (FAO/WHO 2001). Пробіотичні бактерії є природними мешканцями шлунково-кишкового тракту людини, але через дію антибіотичних сполук (наприклад, лікування інфекцій антибіотиками) кількість корисних бактерій сильно знижується. Тому важливо відновити їх рівновагу в кишечнику, постачаючи із зовнішнього джерела у вигляді препаратів чи добавок до харчування (наприклад, заквасок, молочнокислих продуктів).

Основні стреси, які переживають пробіотики в процесі виробництва кисломолочних продуктів, є висока температура, заморожування, осмотичний тиск тощо. Після прийому з їжею або у формі капсул бактерії піддаються дії дуже жорсткого кислого середовища в шлунку, де рН коливається від 1,0 до 2,0, а потім дії шкідливих жовчних солей, що знаходяться в кишечковому шляху (Semyonov 2012). Загалом, очевидно, що для успішної доставки життєздатних пробіотичних культур від етапу культивування та росту до колонізації на стінках кишечника, необхідно забезпечити додатковий захист мікроорганізмів.

#### **Характеристика бактерій роду *Lactobacillus***

Лактобацили – одні з найпоширеніших пробіотичних організмів, для яких характерні такі властивості: грампозитивні, неспороутворюючі, каталазо- та оксидазо-негативні, позбавлені цитохромів, неаеробні за своєю природою, але можуть до певної межі переносити кисень, досить вимогливі до умов культивування. Кінцевим продуктом їх цукрового бродіння є молочна кислота (Anal 2007). Вони позитивно впливають на здоров'я кишківника шляхом покращення травлення, стимуляції імунітету та протипатогенної функції. Бактерії цього роду не є основними представниками мікрофлори ШКТ, однак вони зазвичай

досить легко заселяють кишківник, тому довгий час вони використовувались у продуктах харчування як біологічно активні добавки (Stanton 2003).

*Lactobacillus salivarius* відомий своїми стійкістю до кислотного середовища та жовчі, гарною адгезією до клітин шлункового епітелію і транспортабельністю по кишковому тракту. До групи комплексу *Lactobacillus casei* входять: *Lactobacillus casei* / *paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG (Quigley 2019).

### **Характеристика бактерій роду *Bifidobacterium***

Представники роду *Bifidobacterium* є грампозитивними, не мають рухливості чи спороутворення. У експоненційній та ранній стаціонарній фазах росту мають паличковидну чи коковидну форми. Упродовж подальшого росту клітини стають схожими на розгалужені та розділені нитки. Наразі із кишечника людини та тварин було виділено більш ніж 30 видів біфідобактерій (Dianawati 2014).

Кінцевими продуктами ферментації глюкози для цих мікроорганізмів є оцтова та молочка кислоти. Ці штами не характеризуються гарною кислотостійкістю, однак здатні розвивати механізми адаптації до несприятливих умов середовища, включно із рН 4,0–4,2 (Dianawati 2014). Відзначається можливість деяких представників *B. animalis* та *B. thermacidophilum* вижити за рН 3,5–4,0. Біфідобактерії також анаероби, однак такі штами, як *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* та *Bifidobacterium thermophilum* вважаються мікроаерофілами (Li 2010).

Середовищем проживання біфідобактерій є товста кишка. Штамовий склад бактерій відрізняється у людей різного віку, так у немовлят домінуючими є *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* і *B. breve*, тоді як в дорослих це третій за чисельністю мікроорганізм, що населяє товстий кишечник із домінуванням *Bifidobacterium longum* і *B. adolescentis*. Саме тому ці штами використовують як пробіотичні культури (Nag 2019).

За стійкістю до низьких рН та жовчі біфідобактерії відрізняються залежно від штаму. Такі види, як *B. longum*, *B. pseudolongum* і *B. animalis* мають високу

кислотостійкість за своєю природою, а *B. longum* виживає за концентрації жовчі до 4,0% (Stanton 2003).

### **Характеристика бактерій роду *Streptococcus***

*S. thermophilus* – це грампозитивні бактерії, що характеризуються овоїдною (яйцевидною) формою клітин, які можуть збиратися попарно чи в короткі ланцюжки. Мікроорганізми краще ростуть за підвищених температур (про що і свідчить її видова назва) та її температурний оптимум становить 42°C. На відміну від більшості біфідо- та лактобактерій, що є анаеробами, цей мікроорганізм аеротолерантний. *S. thermophilus* належить до групи *salivarius*, яка також включає *S. salivarius* та *S. vestibularis* (Gao 2014, Facklam 2002).

*S. thermophilus* – єдиний вид стрептококів, який використовується в харчовій промисловості. Оскільки він споживається людьми протягом століть, не викликаючи жодних захворювань, це також єдиний вид стрептококів, який американське Управління з контролю за продуктами та ліками (FDA) визнало загально визнаною безпечною бактерією. *S. thermophilus* є одним з основних заквашувальних мікроорганізмів (Uriot 2017).

## **1.2 Відомі терапевтичні ефекти пробіотичних препаратів**

Механізм впливу, що забезпечується пробіотичними штамами, на людський організм, добре описаний у ряді робіт (Kailasapathy 2002, Isolauri 2005, Andersson 2001). Ці мікроорганізми підсилюють природні захисні сили організму-хазяїна та за допомогою конкурентного виключення, усуваючи патогенні бактерії, прокладають свій шлях до росту та колонізації на стінках кишечника (Anal 2007). Механізм антипатогенної дії характеризується кількома властивостями, що включають:

- зниження значення рН у просвіті кишечника шляхом продукування ряду летких жирних кислот із коротким ланцюгом (SCFA);

- створення недоступності умов отримання поживних речовин патогенами;
- зниження окисно-відновного потенціалу, створюючи придатні умови для анаеробного росту;
- продукування перекису водню в анаеробних умовах;
- вироблення сполук-інгібіторів збудників (бактеріоцинів) (Nag 2019).

Вплив основних пробіотичних штамів на вивчені хвороби ШКТ подано в таблиці 1.1

Таблиця 1.1 – Використання пробіотиків у профілактиці лікуванні хвороб (Nag 2019)

Назва штаму	Вивчений вплив на профілактику чи лікування <u>хвороб</u>
<i>L. bulgaricus</i>	Стійкість йогуртової закваски до антибіотиків; покращення імунітету у людей похилого віку ( <i>L.delbrueckii subsp. bulgaricus</i> 8481); антибактеріальна дія проти кишкової палички; модуляція мозкової діяльності (Makino 2010).
<i>B. longum</i>	Профілактика та лікування некротизуючого ентероколіту у но-вонароджених; зменшення діареї, викликаной опроміненням (при радіотерапії); зменшення некротизуючого ентероколіту за допомогою асоціації культур <i>Bifidobacteria</i> ( <i>B. breve</i> , <i>B. infan-tis</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B. longum</i> ); зменшення симптомів синдрому по-дразненого кишечника; лікування шлунково-кишкових захворювань ( <i>B. longum</i> CMCC P0001); перинатальне втруча-ння проти початку алергічної сенсibiliзації ( <i>B. longum</i> CCM 7952).
<i>S. thermophilus</i>	Зменшення симптомів синдрому подразненого кишечника; стійкість антибіотиків до закваски йогурту; зменшення некротизуючого ентероколіту у недоношених дітей (Ito 2008).

### 1.3 Інкапсулювання пробіотичних клітин у різноманітні матриці



Інкапсуляція пробіотиків є методом підвищення виживаності мікроорганізмів як у кисломолочному продукті, так і в шлунково-кишковому тракті. Вченими було здійснено ряд досліджень, в яких показано, що використання захисних речовин сприяє виживаності культур та їхній стійкості проти низьких показників рН та жовчі. У роботі (Haffner 2016) повідомлено про інкапсуляцію *Lactobacillus rhamnosus* GG за допомогою альгілату та кремнезему із перевіркою виживаності у змодельованих умовах ШКТ. Показано, що найкраща життєздатність клітин спостерігалася за буферності внутрішнього ядра (за додавання HCl-трис та рН 8) порівняно з водою. До того ж, мікрочастинки, які було мінералізовано у водному розчині, також мали вищий показник виживаності, ніж мінералізовані в органічній фазі з гексаном. Мезопориста структура (<50 нм) кремнезему додатково сприяла утриманню клітин всередині частинки, при цьому дозволяючи метаболітам, необхідним для росту бактерій, вільно дифундувати.

У роботі (Ding 2009) проаналізовано вплив різноманітних матриць на виживаність пробіотиків у йогурті та умовах низьких рН і за наявності жовчі. Так, мікроінкапсуляція з рядом матеріалів (ксантановою камеддю, альгілатом, гуаровою камеддю, камеддю ріжкового дерева та карагенановою камеддю) показала кращу виживаність таких бактерій порівняно з нативними за рН=2 та високої концентрації жовчних солей. Ксантанова та карагенанова камеді показали такий самий ефект, як і альгілат, ефективність якого було підтверджено іншими дослідженнями. Тому ці речовини визнано потенційно придатними для доставки життєздатних пробіотичних клітин до шлунково-кишкового тракту організму-хазяїна.

Вченими (Kailasapathy 2006) проведено інкапсуляцію пробіотиків за допомогою екзополісахаридів, що виробляються самими пробіотиками, альгілатної матриці та полімеру-наповнювача, яким слугував крохмаль. Після цього створено кисломолочний продукт, заквашений такими бактеріями та показано, що термін зберігання такого йогурту значно збільшився і складав більше 7 тижнів. Використання таких речовин незначно вплинуло на смак, аромат та

кислотність йогурту, однак суттєво змінило його структуру та найбільшою проблемою став синерезис (зменшення об'єму гелю за рахунок відділення рідини), що вказує на необхідність подальших досліджень із використання даних матеріалів.

Матеріали на основі молока, зокрема молочний білок казеїн, теж можуть бути матрицями для доставки пробіотичних клітин. Вони характеризуються високим показником біосумісності. До того ж, у дослідженні (Heidebach 2009) показано, що гелювання суспензій казеїну із пробіотичними клітинами, каталізоване трансклутаминазою. У результаті утворюється досить щільний гелевий каркас, здатний захистити клітини від кислотних умов ШКТ (було перевірено за рН 2,5 та рН 3,6), тому казеїнова матриця є перспективним матеріалом для інкапсуляції пробіотичних клітин з метою збереження їх виживаності на шляху до цільового органу.

У дослідженні ефективності кормових сорбованих пробіотиків показано, що використання сорбентів дає змогу зменшувати дозу препарату. Так, пробіотик Біфідумбактерин форте, основою для якого є активне вугілля, має у складі не менш, ніж  $10^7$  КУО/г пробіотичних мікроорганізмів. Така кількість співрозмірна із такою у кисломолочних продуктах, однак менша за рекомендовану для використання у пробіотичних препаратах (Ушакова 2012).

#### **1.4 Кремнеземові сорбенти та їх класифікація**

За даними літератури (Гусейнов 2012, Девришов 2013), речовини, що мають адсорбуючі властивості, зокрема ентеросорбенти, можна характеризувати:

1) за типом речовини, що є в їх основі (активне вугілля, ентеросгель, силлард, каолін, цеоліт, білігнін тощо);

2) за властивостями структури, що пов'язані із ефективністю сорбції (високодисперсні порошки, мікрОВОлокна, пористі сорбенти);

- 3) за консистенцією (ксерогелі, що є твердими порошкоподібними сорбентами, гідро-, таліогелі, суспензії, речовини, що набухають у воді);
- 4) за природою поверхні (ті, поверхня частинок яких має гідрофільні властивості, поверхня частинок із гідрофобними властивостями, змішані);
- 5) за лікарською формою (гранули, порошки, таблетки, пасти, гелі, суспензії, колоїди інкапсульовані, дражовані лікарські форми, дієтичні добавки);
- 6) за структурою (активовані вугілля, силікагелі, цеоліти, алюмогелі, алюмосилікати, карбіди, оксиди, харчові волокна);
- 7) за сорбційним механізмом (адсорбуючі речовини, абсорбуючі речовини, іонобмінники, зі змішаним типом сорбції, сорбенти із каталітичною дією);
- 8) за селективністю (неселективні, монофункціональні селективні, бі- та поліфункціональні).

Усі відомі кремнеземи поділяються на кристалічні та аморфні форми (рис. 1.1).

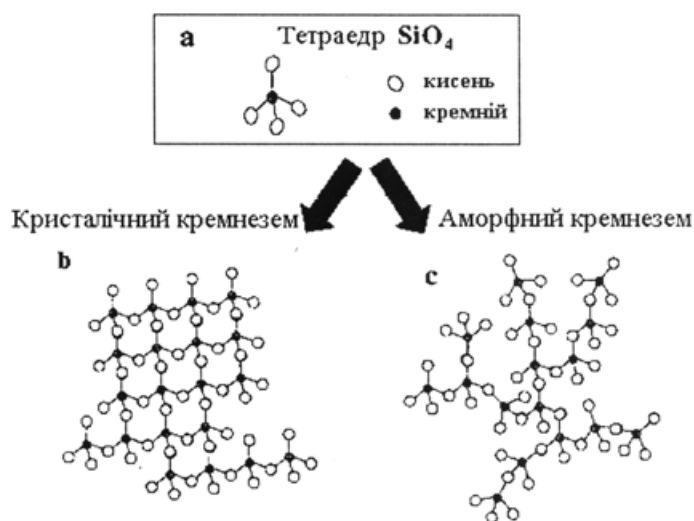


Рисунок 1.1 – Схематична будова форм кремнезему (Зайцева 2014).

Аморфний кремнезем може бути природнім (скелет дітових водоростей, опал, кварцеве скло) або штучним (пірогенний кремнезем, колоїдний кремнезем). На відміну від природних кремнеземів, частинки штучних не мають гострих кутів та характеризуються правильною сферичною будовою.

Класифікація аморфних кремнеземів базується на різній будові їх матриці. Аналізуючи пористу природу цього типу кремнеземів, вчені поділяють їх на такі класи:

- макропористі (розмір пор сягає більше 200 нм);
- мезопористі (з розміром пор у межах 2-50, за іншими джерелами від 2 до 200 нм);
- мікропористі (з порами менше 2 нм);
- непористі

Перший клас кремнеземів також називають аеросилогелями чи силохромами. Вони характеризуються досить низькою питомою площею поверхні, що дорівнює менше 135 м<sup>2</sup>/г та мають великі за розміром частинки (200 нм та більше). Силікагелі, що мають питому площу поверхні меншу за 600 м<sup>2</sup>/г, а також пористе скло відносять до мезопористого класу кремнеземів. Абсолютно мікропористих кремнеземів існує досить мало, але силікагелі та силосани мають досить велику кількість мікропор. Непориста модифікація кремнезему – аеросил (Aerosil™ та Cab-O-Sil™) – має площу поверхні до 300 м<sup>2</sup>/г та малий розмір частинок (7-40 нм) (Fubini 2001).

Функціональні групи кремнеземів представлені кількома типами (рис. 1.2).

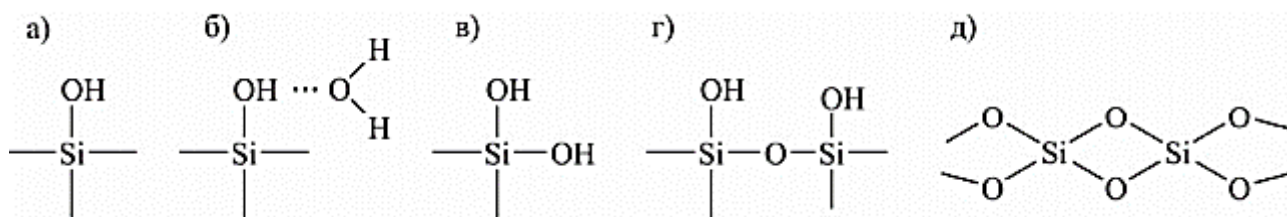


Рисунок 1.2. Типи груп на кремнеземовій поверхні: а – силанольні; б – силанольні, пов'язані з молекулою води водневими зв'язками; в – гемінальні, або силандіольні; г – віцинальні; д – силосанові (Лисичкин 2003).

За даними літератури, основними групами кремнезему є силанольні, адже їхня реакційна активність найбільша. Вони особливі слабокислою реакцією гідрогену, здатного вступати в реакції обміну. Ця відмінність допомагає у приєднанні органічного компонента в процесі модифікації кремнезему.

Наявність гідроксильних груп може спостерігатися в об'ємі кремнезему, а не тільки на його поверхні. Такі групи відносять до скелетних, вони не є учасниками хімічної модифікації, але мають вплив на фізичні та хімічні властивості кремнеземів. Кількість таких груп у різних типів кремнезему відрізняється. У мезопористому кремнеземі із  $S_{\text{пв}}=285 \text{ м}^2/\text{г}$  їх майже немає.

Виходячи з аналізу спектроскопічних та хімічних властивостей кремнеземів за різних температур запропоновано його загальну формулу, яка враховує існування силоксанових, силанольних та силандіольних груп та описує співвідношення між ними:  $(\text{SiO}_2)_{1-5,5x}(\text{SiO}_{5/2}\text{H})_{4,5x}(\text{SiO}_3\text{H}_2)_x$

### 1.5 Властивості відомих ентеросорбентів на основі кремнеземів

Відомо, що іммобілізація пробіотичних клітин сприяє захисту останніх (зокрема біфідо- та лактобактерій) під час проходження верхніх шляхів ШКТ, де нативні препарати втрачають свою активність майже повністю (більш ніж на 90%) (Ушакова 2012).

Кремнійорганічний ентеросорбент (Ентеросгель) є гідрогелем поліметилсилоксану – просторово зшитою пористою матрицею з жорсткою глобулярною структурою, утвореною силоксановим ланцюгом, що містить біля атомів кремнію метильні і гідроксильні групи. Наявність вуглецевих радикалів в структурі молекули забезпечує високу спорідненість з органічними речовинами (токсичними метаболітами різної природи), а присутність гідроксильної групи обумовлює іонообмінні властивості цієї сполуки. Завдяки зазначеним властивостям ентеросгель вибірково сорбує токсичні метаболіти: речовини з

молекулярною масою від 70 до 1000 а.о.м. (сечовина, холестерин, білірубін, середньомолекулярні пептиди) сорбуються активно; речовини з молекулярною масою менше 70 і більше 1000 а.о.м. (іони металів, мінеральні солі) сорбції не піддаються, тобто препарат є селективним ентеросорбентом. (Пентюк 2004).

Силікс, або СиллардП – порошок, що є синтетичним високодисперсним аморфним кремнеземом, розробленим на основі нанорозмірного  $\text{SiO}_2$ . Змішується з водою з утворенням суспензії і з випаданням сорбенту в осад. Швидка адсорбція забезпечується сферичним розміром частинок Силіксу (Луцюк 2003). Розробка препарату проводилася співробітниками кафедри фармакології та клінічної фармакології Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця та Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України, наразі він випускається підприємством «Біофарма». Перевагою Силіксу над іншими ентеросорбентами є властивість прикріплюватися до мембран мікроорганізмів через нанорозмірність матеріалу, на відміну від інших препаратів, які спричиняють сорбцію клітин на їх поверхні (Чорна 2016).

## **1.6 Механізм взаємодії кремнеземових сорбентів із біологічними об'єктами**

Дані літератури дають змогу зв'язати біологічні ефекти кремнезему з такими його властивостями, як форма та розміри частинок, площа поверхні, кількість силанольних груп, ступінь гідрофільності, індекс кристалічності, наявність атомів інших елементів, здатність поверхні до генерування радикалів кисню та вибіркової адсорбції біологічно значимих молекул (Пентюк 2004, Воронін 1999).

Робота (Wehling 2013) показує, що різні розміри частинок (15, 50 і 500 нм) не призводили до значного зниження кількості КУО відносно контрольних зразків у вивченні впливу цих частинок на виживаність бактерій *B. subtilis*, *B. megaterium* та *E. coli*.

Після проведення атомно-силової мікроскопії (AFM) експерименти на бактеріях *E. coli* з наночастинками кремнезему від 4 до 100 нм, вчені (M. B.-H.-B. Mathelié-Guinlet 2017) спостерігали критичний діаметр частинок в діапазоні 50-80 нм. Таким чином, хоча частинки менші за цей розмір призводили до часткового колапсу або лізису клітинної мембрани, більші частинки не справили жодного впливу на бактеріальну морфологію.

Визначено, що основним типом взаємодії між частинками кремнезему та клітиною є притягання білків зовнішніх мембран клітини (зокрема мембранних фосфоліпідів) (Чуйко 2003). Так, у разі надходження кремнезему інгаляційним шляхом, перш за все, відбувається взаємодія з білками та ліпідами суфрактанту, що є поверхнево активною речовиною, що вистилає альвеоли. Після цього частинки сорбенту фіксуються на поверхні клітин. Механізм же притягання білків або фосфоліпідів із кремнеземовими частинками заснований на взаємодії силанольних дисоційованих груп із аміногрупами, що є протонованими у бокових ланцюгів білків (або зв'язки водневого типу, що утворюються між молекулою білка та силанольною групою), або взаємодії з фосфатидилхоліном, а саме з триметиламонієвою групою холіну. Саме тому кількість силанольних груп та площа поверхні частинок чинять значний вплив на величину сили сорбції (Чуйко 2003, NIOSH 2002). Гідрофільний/гідрофобний баланс також залежить від числа силанольних груп на поверхні кремнезему. Показано, що кристалічний кремнезем внаслідок нагрівання до 500, 800 та 1300 1300°C, втрачає частину силанольних груп, у зв'язку з чим знижується рівень гідрофільності його поверхні і, відповідно до цього, зменшується цитотоксичний ефект відносно макрофагів альвеол (Martra 2003).

Геращенкою були проаналізовані взаємодії нанодисперсного кремнезему з біологічними мембранами (Геращенко 2009). Автор звернув увагу на важливість поверхневого заряду клітини у взаємодії з сорбентом, а також зауважив, що за використання нанорозмірного кремнезему має місце сорбція його частинок на поверхні клітин, а не навпаки. Це пояснюється різницею у розмірах бактеріальних

клітин (0,2–10 мкм) із розмірами частинок даного типу кремнезему, що є на порядок меншими. У роботі, описаній вище, підтверджено припущення про денатурацію чи екстракцію трансмембранних білків ліпідного бішару під дією нанокремнезему за допомогою силанольних груп на його поверхні. Зміни у мембрані, опосередковані кремнеземом, корелювали із часом витримки і концентрацією сорбента у суспензії.

У роботах запропоновані дещо інші механізми взаємодії кремнеземів із мембранами, зокрема механізми гемолізу. Згідно з ними (B. Fubini 1998), гемолітичну активність можуть викликати водневі зв'язки між силанольними групами та компонентами мембрани або внаслідок негативного заряду таких груп кремнезему. Ще одна теорія вказує на можливість гемолізу через пероксидне окиснення ліпідів мембран через гідроксильні радикали та пероксид водню (Dalal 1990). Як наслідок подальших досліджень, опубліковано теорію про вибірковість гемолітичної активності нанокремнеземів, що полягає у різниці щільності негативного заряду на поверхні клітин. Так, старі клітини мають менше негативно заряджених залишків сіалових кислот на поверхні, а тому підлягають гемолізу значно частіше за молоді еритроцити.

То ж у роботі (Геращенко 2009) сформульовано припущення, що ґрунтується на літературних та власних даних, про механізм зв'язку тваринних клітин та нанокремнезему. Згідно з ним, основним типом взаємодії є електростатичне притягування негативно заряджених частинок нано-SiO<sub>2</sub> та позитивно заряджених тетраметиламонієвих груп, що є частиною фосфоліпідів мембрани (лецитину та сфінгомієліну зокрема). Мембранні глікопротеїди містять негативно заряджені залишки сілової кислоти, що, навпаки, негативно впливають на адсорбцію.

Наступним кроком після адсорбції є взаємодія дисоційованих силанольних груп із протонованими аміногрупами бічних ланцюгів мембранних білків або ж утворення водневих зв'язків між силанольними та вторинними амідними групами білків. Також описано залежність між взаємодією поверхні клітини та розміром частинок кремнезему, згідно з якою внаслідок взаємодії з дрібними частинками



відбувається блокування адсорбційних центрів на клітинній поверхні. Більші ж частинки взаємодіють із клітинами, сорбуючи її мембранні білки та фосфоліпіди, чим порушують цілісність мембрани.

Мембрани мікроорганізмів також досить добре адсорбують нанорозмірний кремнезем, причому це стосується як грампозитивних так і грамнегативних, що було показано в роботах (Бондарчук 1998). Також привертає увагу процес аглютинації у разі дії нанорозмірного кремнезему, що відбувається за умови наявності не менше  $6,6 \cdot 10^5$  частинок нанокремнезему на одну мікробну клітину. Дані ж, отримані після обробки клітин речовинами, що руйнують мембрану, вказують на важливе значення мембранних білків у механізмі зв'язування із нанокремнеземом. Про це свідчить зниження мембранотропної активності сорбенту після модифікації мембран шляхом додавання до клітинної суспензії трипсину, лізоциму та ЕДТА.

Робота (І. І. Геращенко 2009) показує відмінну (98-99%) здатність Силіксу адсорбувати представників патогенної мікрофлори *P. vulgaris* і *C. albicans*, що, на думку авторів, пояснюється високою спорідненістю сорбента до фосфоліпідів та глікопротеїдів мембран, а також до інших структур білкової природи, що розташовуються на поверхні клітин.

## 1.7 Модифікації кремнеземів

Незважаючи на всі переваги, які кремнеземові сорбенти представляють як системи доставки ліків (DDS) для лікування різних патологій (Wang, et al. 2015, Vallet-Regí 2010), не існує ідеального матеріалу, який можна було б використовувати самотійно. Все частіше наукове співтовариство приділяє більше часу об'єднанню різних матеріалів, властивості яких можна комбінувати для отримання більш полівалентних матеріалів. Поєднання мезопористих кремнеземів з іншими елементами, такими як наночастинки золота або срібла, квантові точки, і

різні полімери або молекули, можуть надавати сорбенту протимікробного синергетичного ефекту (Baeza 2015).

Кремнеземні матеріали мають на своїй поверхні велику кількість силанольних груп, що дає змогу легко змінити фізико-хімічну природу поверхні за допомогою процесу функціоналізації, надаючи їм більшої універсальності, оскільки наявні можливості:

- додавати барвники у структуру, щоб виявляти і відстежувати розвиток інфекцій. Прикладом є робота (Chen 2012) із використанням матриці з флуоресцентно модифікованого кремнезему та магнітних наночастинок, що разом із антибіотиком використовувалися для захоплення *S.aureus*. Показано, що такі матриці можна використовувати для захоплення грампозитивних бактерій;

- включення позитивних функціональних груп, які викликають руйнування зовнішньої мембрани бактерій задля реалізації антибактеріальної дії (Mathelié-Guinlet, et al. 2014);

- розробки структур, що реагують на подразники (Paris, et al. 2018).

### **Модифікація поверхні кремнію**

Фізичні впливи можуть спричиняти модифікації поверхні кремнію. . Наприклад, у роботах (Макара, та ін. 2009, Стебленко 2010) проводили обробку поруватого та кристалічного кремнію за допомогою слабого магнітного поля. Результати вказують на зміни структури кремнієвих пластинок, зокрема статичне МП сприяло утворенню позитивних зарядів кремнієвої поверхні. Це може бути пояснено переходом домішок із товщі зразку назовні або адсорбцією з атмосфери. Такий ефект сприяв кращому зв'язуванню дріжджових клітин із тими ж пластинками кремнію, обробленими у слабкому магнітному та НВЧ полях, як показано у роботах (Marynchenko 2020, Nizhelska 2018). До того ж, спостерігалось значне покращання збережуваності форми клітин, щодо яких було застосовано магнітну та електромагнітну обробку, адже їх форма залишалася стабільно чіткою впродовж довгого періоду (до 2 років).

Більш докладне вивчення впливу магнітного поля ( $B=0,15-0,20$  Тл) на кремній, що має різну провідність, показало зменшення відносної мікротвердості матеріалу, підвищення електричного потенціалу поверхні (за який відповідають зарядові стани дефектів). Повторно визначено, що позитивні іони домішок переміщуються до поверхні кремнію та цим збільшують кількість хемосорбційних зв'язків (В. А. Макара 2014). Саме тому можна зробити висновок про «активуючий» вплив слабого магнітного поля на поверхню кремнію.

### **1.8 Взаємодія пробіотиків та сорбентів на основі кремнезему**

Було здійснено спроби сумісного культивування кремнеземів із пробіотиками, зокрема показано, що додавання до середовища Аеросилу А300 в кількості 2 % сприяло приросту біомаси від 40 до 75 %, що корелювало зі збільшенням кислотності; антагоністична активність пробіотичних штамів *L. plantarum* та *B. adolescentis*, *S. lactis* суттєво не змінювалась (Гужвинська 2011). Також було показано ефективність інкапсуляції *Lactobacillus rhamnosus* в мезопористий альгінат-кремнезем з моделюванням поведінки клітин у ШКТ.

Імобілізовані пробіотики спричиняли швидше повернення мікрофлори товстої кишки у щурів із хіміотерапевтичним дисбіозом до нормального стану та елімінації патогенної мікрофлори, ніж дія нативних пробіотиків, ентеросорбентів та сумішей пробіотик-сорбент (Бабінець 2016).

Показано, що комплексні препарати пробіотичних культур, імобілізовані на носіях, краще переносять як умови висушування (ліофільно або на розпилювальній сушарці), так і умови, які діють у шлунково-кишковому тракті (Старовойтова 2012). Саме тому, на основі вищезазначеного, агрегати ВДК є перспективною матрицею для використання при розробці пробіотичного препарату, що забезпечує пролонговану дію та захист від жорстких умов верхніх відділів ШКТ.

Таким чином, наявні літературні дані із дослідження іммобілізації пробіотиків описують механізми сорбції лише частково. Визначено, що іммобілізація на кремнеземовому сорбенті як допомагає культурам перенести умови висушування, так і умови верхніх відділів шлунка. За допомогою іммобілізованих пробіотиків мікрофлора щурів швидше поверталася до норми, ніж для нативних. Також обробка магнітним полем чинить позитивний вплив на збережність та цілісність дріжджових клітин. Однак було досліджено лише невелику кількість як пробіотичних культур, так і кремнеземових сорбентів та їх сумісний вплив на стан мікрофлори кишківника. Збережуваність таких препаратів загалом, виживаність різних пробіотичних штамів у процесах сушки та умов ШКТ, параметри кисломолочних продуктів, сквашених за допомогою іммобілізованих пробіотиків, вибір типу сорбенту залишаються недослідженими.

Тому **метою** роботи було дослідження можливостей сорбції пробіотичних культур на зразках сухого високодисперсного кремнезему та гідрогелі метилкремніевої кислоти та оцінка їх функціонального стану.

Відповідно до мети, сформульовано такі **завдання**:

5. Дослідити показники виживаності іммобілізованих пробіотичних препаратів на різних типах сорбентів (порошкоподібному та гідрогелевому) за умов ліофільної сушки, тривалого зберігання за низьких температур та модельованих умов верхніх відділів шлунково-кишкового тракту.
6. Визначити біотехнологічні та реологічні властивості кисломолочного продукту, сквашеного іммобілізованою культурою *S.thermophilus*.
7. Дослідити вплив МП на взаємодію іммобілізованих пробіотичних культур (коків і паличок) з кремнієвою поверхнею методом фрактального аналізу отриманих зображень.
8. Розробити стартап-проект за темою дослідження.

## 2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

### 2.1 Матеріали та методи

#### 2.1.1 Матеріали

##### Пробіотичні культури

Культури обрано з наявних в Інституті продовольчих ресурсів, що використовуються для виробництва закваскових препаратів. Були використані такі чисті культури: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* IMBB-7249, *Bifidobacterium longum* IMB B 7033.

##### Сорбенти

Сорбенти, що використовувалися для іммобілізації клітин:

- Ентеросгель (гідрогель метилкремнієвої кислоти)
- порошкоподібний Силлард П (Силікс);
- Токсин.NET.

**Токсин.NET** – гелеподібна маса без кольору, запаху та смаку, що містить у складі діоксид кремнію та інулін. Випускається ТОВ «Ілан Фарм» у формі пакет-гелю чи пакет-саше. (рис.2.1)

**Ентеросгель**, або метилкремнієвої кислоти гідрогель, є масою біолого кольору, що не має запаху та смаку і не розчиняється у воді. Препарат випускається ПрАТ «ЕОФ «КРЕОМА-ФАРМ», форма випуску: капсули 0,32 г (сухий, ксерогель) чи саше 15 г (гідрогель).



Рисунок 2.1 – Упаковка та пакет-саше препарату «Токсин.NET»

**Силлард П або Силікс** є нанокремнеземом, що має високий показник дисперсності, та має вигляд білого легкого порошку. Сорбент не має запаху та смаку, може бути змішаний із водою за будь-яких пропорцій. Виготовлений Інститутом поверхні імені О.О. Чуйка НАН України (рис.2.2) (Воронін 2016) .



Рисунок 2.2 – Препарат Силлард П.

#### **Обладнання та посуд**

pH-метр;

Бінокулярний мікроскоп Motic (FischerBioblock)

мікроскоп AXIOObserverA1MofCarlZeisscompany із вмонтованою відеокамерою TopView 1000

Ваги електронні Adventurer OHAUS;

Віскозиметр ротаційний “RHEOTEST II”

Пластики кремнію КДБ-5 (100) Semicor Solar

Сублімаційна сушарка ТГ15

Сухожар;

Термостатна шафа;

Центрифуга;

Морозильна камера;

Постійний магніт індукцією  $B=0,01$  Тл

Постійний магніт індукцією  $B=0,17$  Тл

Шейкер CERTOMAT® SII;

Мікробіологічна петля;  
Пінцет;  
Піпетки мірні 1 см<sup>3</sup>;  
Покривні скельця;  
Предметні скельця;  
Пробірки скляні;  
Спиртівки;  
Стерильні флакони 10 см<sup>3</sup> скляні;  
Чашки Петрі скляні;  
Штативи для пробірок;  
Бюретка;  
Гумові пробки для флаконів;  
Колби різного об'єму конічні скляні;

### **Матеріали, реактиви**

Генціанвіолет  
Аміаку водний розчин 25%  
Вода здистильована  
Натрій хлористий (NaCl)  
Розчин соляної кислоти із рН=2,2  
Молоко жирністю 2,5%  
Розчин фізіологічний  
Вода  
МРС-агар (Ман, Рогоза, Шарп)  
МРС бульйон (Ман, Рогоза, Шарп)  
Середовище ГМ (гідролізат молока)  
Середовище ГА (гідролізований агар)  
Середовище Блаурокк

## 2.1.2 Методи досліджень

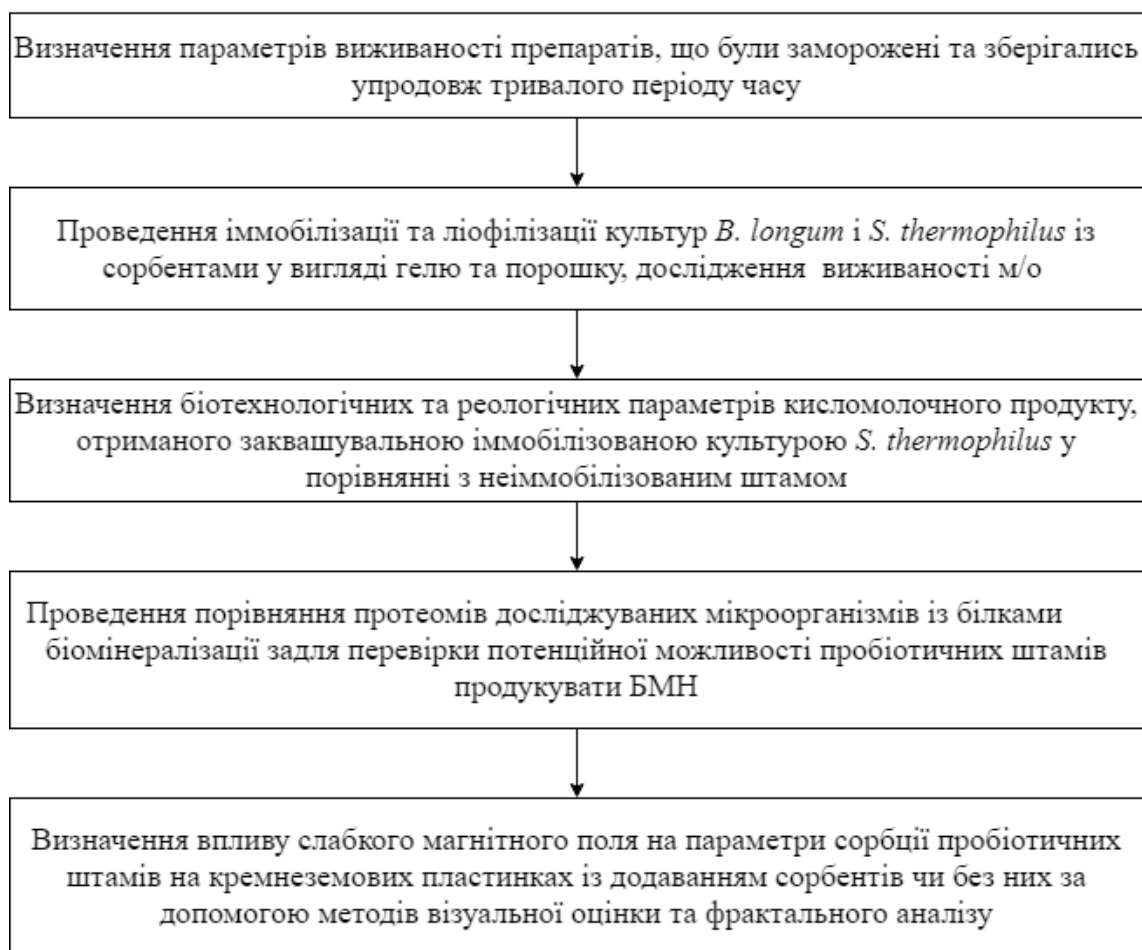


Рисунок 2.3 – Загальна схема проведених експериментів

### Підготовка пробіотичних культур

Культури *Streptococcus thermophilus* IMBB-7249, *Bifidobacterium longum* IMB В 7033 витримували за температури (38-41) °С (для термофільних видів) у різних середовищах: молочнокислі бактерії – у МРС-бульоні (Ман, Рогоза, Шарп), біфідобактерії – у середовищі Блаурокк. Біомасу наведених вище культур було нагромаджено шляхом витримки у термостаті за температури 37±2°С упродовж 14-15 год. При цьому середовище періодично нейтралізували за допомогою розчину аміаку 25% задля досягнення рівня рН=6,±0,1. Сепарацію біомаси, необхідної для подальших дослідів, та культуральної рідини проводили центрифугуванням у такому режимі: частота



сягала

$15000 \text{ хв}^{-1}$ , температура  $(8 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

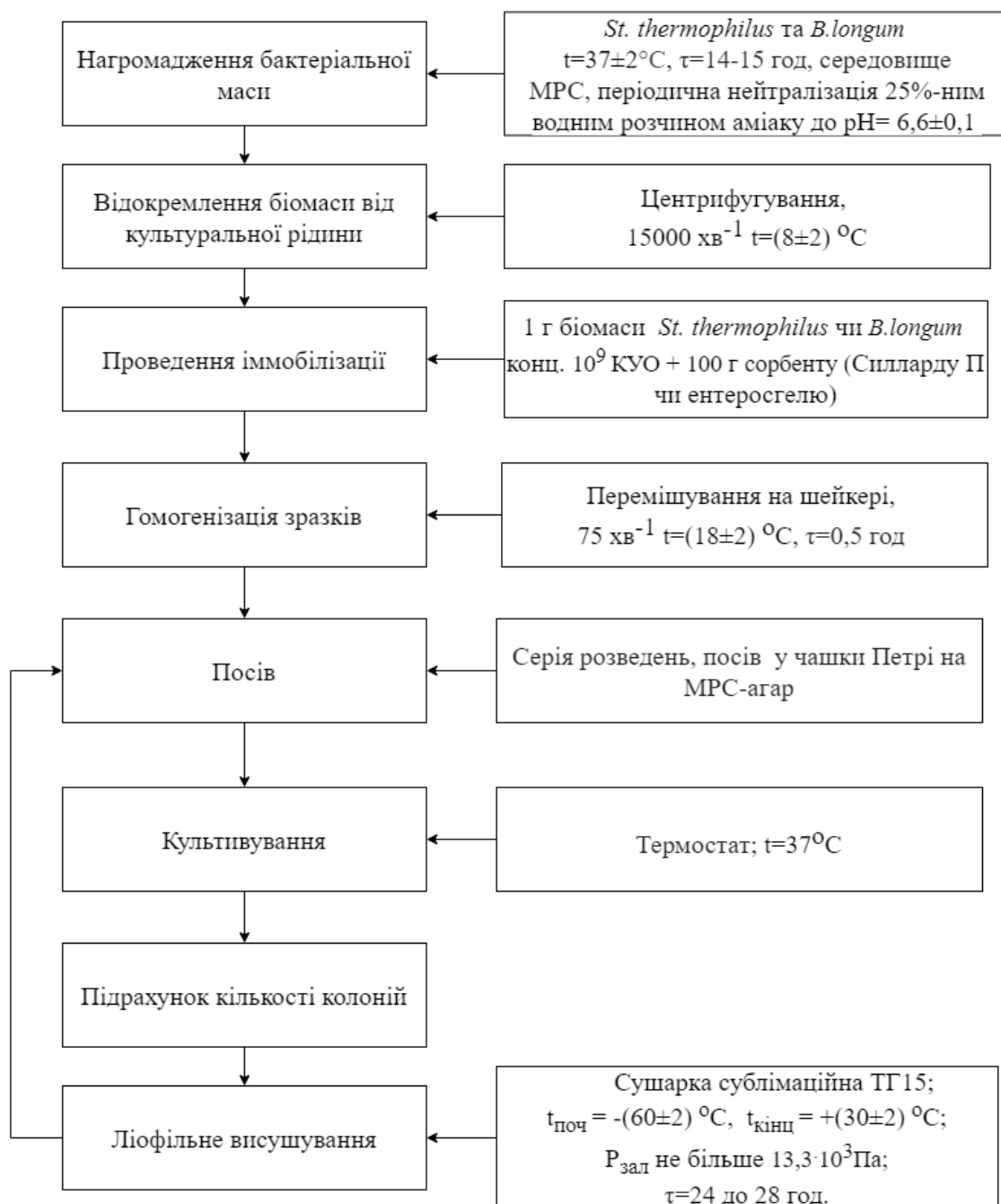


Рисунок 2.4 – Схема дослідів із визначення впливу ліофільної сушки на виживаність іммобілізованих та неіммобілізованих пробіотичних штамів

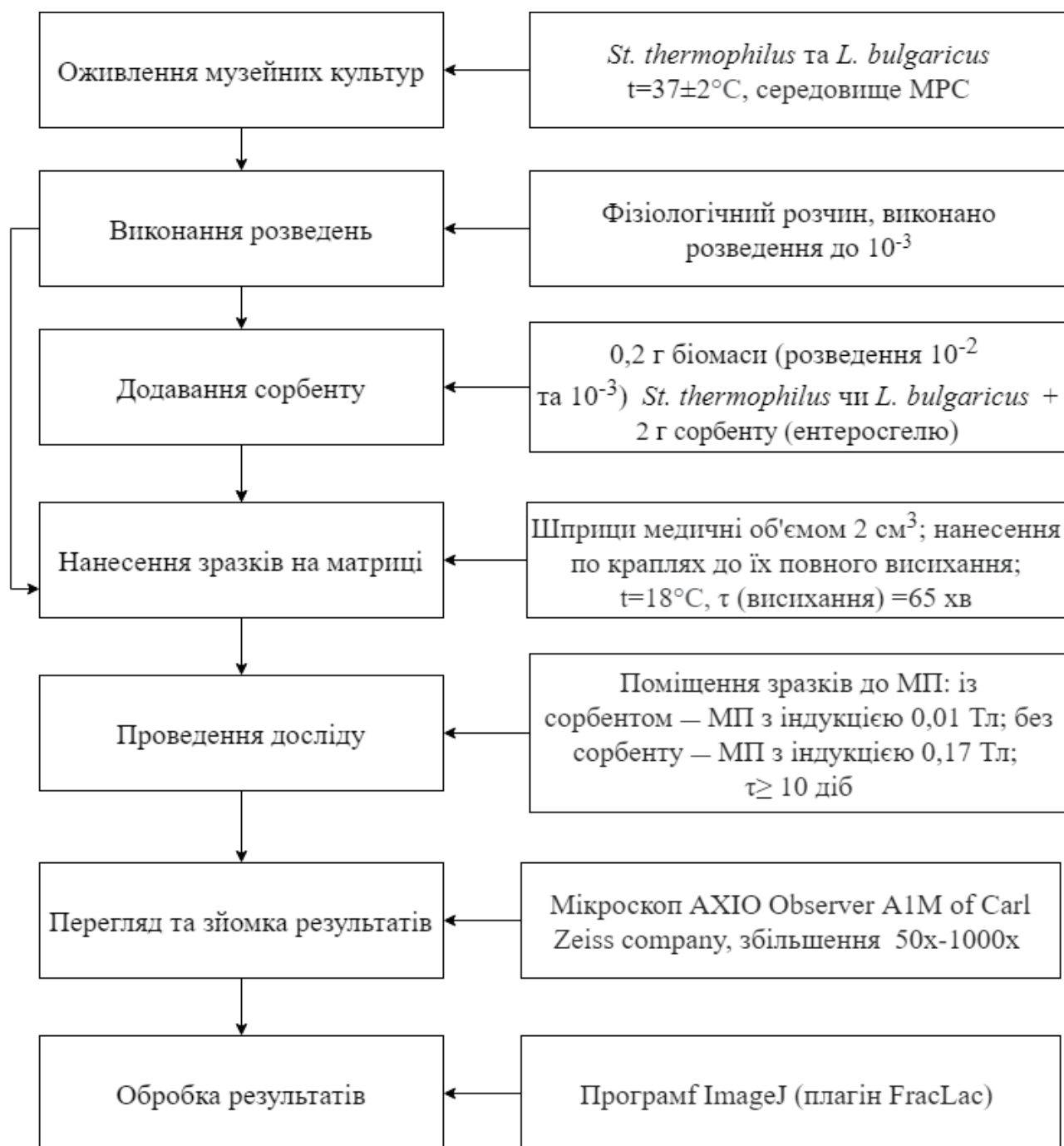


Рисунок 2.5 – Схема дослідів із впливу магнітного поля на сорбцію високодисперсного кремнезему та пробіотичних клітин

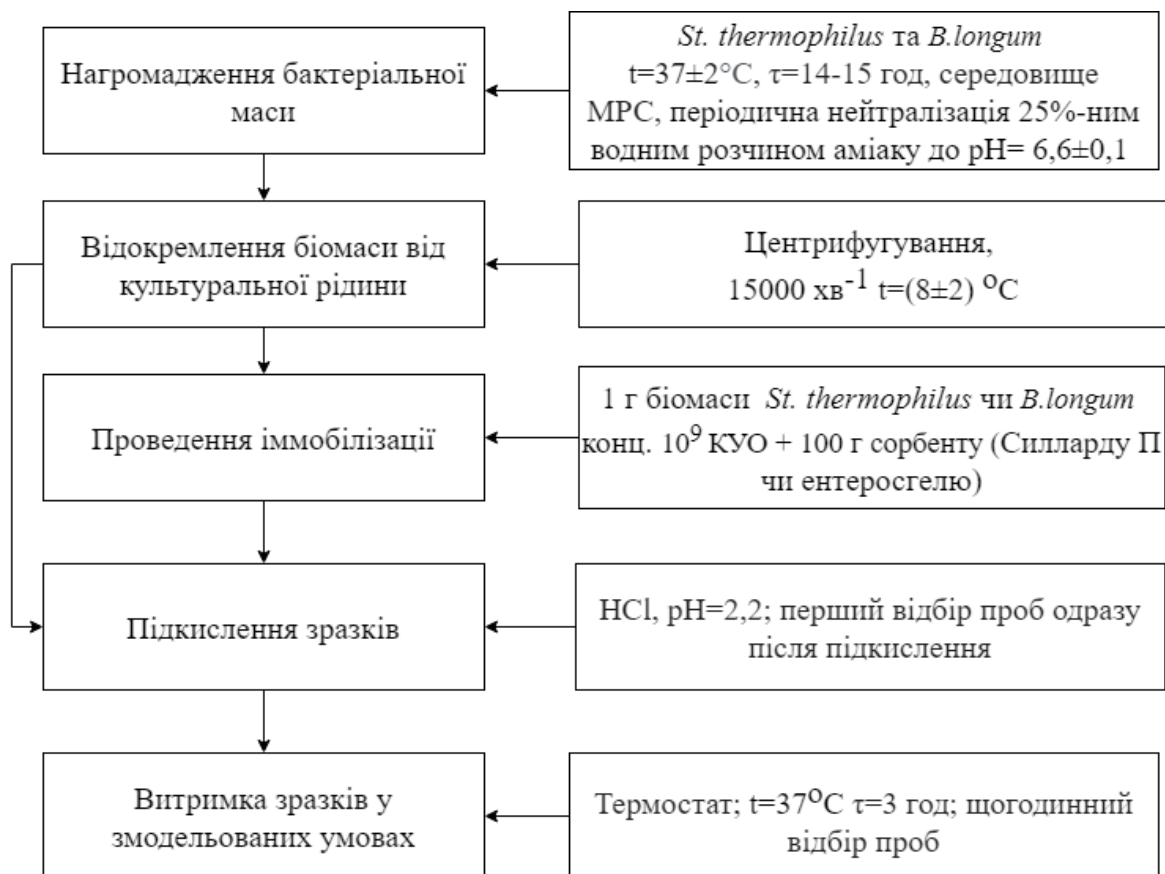


Рисунок 2.6 – Проведення дослідів із моделюванням умов верхніх відділів ШКТ

### Проведення іммобілізації та ліофільної сушки

Для проведення іммобілізації було внесено по 100 г сорбенту до колб та додано по 1 г культуральної біомаси вищенаведених штамів концентрацією  $10^9$  клітин. Задля скорочення процесу було проведено перемішування на шейкері за частоти  $75 \text{ хв}^{-1}$ , температури  $18^{\circ}\text{C}$  упродовж іммобілізації.

Досліджувані зразки було забарвлено генціанвіолетом, після чого досліджено із використанням мікроскопів Motic Fischer Bioblock (має вмонтовану відеокамеру Top View 1000) зі збільшенням у чотириста разів, а також AXIO Observer A1M of Carl Zeiss company зі збільшенням у тисячу разів.

Через необхідність захисту зразків під час ліофільної сушки, до них було додано стерильне захисне середовище такого складу: сахароза 10%, натрій

лимоннокислий 5%, молоко знежирене сухе 5% та розлито до флаконів у кількості 1 см<sup>3</sup>. Режими сушки:

- температура на початку процесу –  $(-60 \pm 2)$  °C упродовж 18 годин;
- температура закінчення процесу +  $(30 \pm 2)$  °C упродовж 12 годин;
- Значення залишкового тиску  $\leq 13,3 \cdot 10^3$  Па;
- Час проведення процесу: 24-28 год.

#### **Вивчення кислотостійкості зразків у змодельованих умовах**

Дослідження кислотостійкості зразків пробіотичних культур *St. thermophilus* та *B. longum* у змодельованих умовах шлунка було проведено за методикою (Voke 2010).

#### **Визначення біотехнологічних характеристик кисломолочного продукту**

Задля визначення основних біотехнологічних характеристик, за допомогою штаму *S. thermophilus* (із додаванням сорбенту та без нього) було сквашено молоко жирністю 2,5%. Сквашування відбувалося за допомогою додавання культуральної рідини або іммобілізованого препарату кількістю 1 г/л із попередніми пастеризацією та охолодженням молока. Було визначено біотехнологічні (органолептичні, титрована та абсолютна кислотність тощо) та реологічні характеристики готового продукту. Кінець сквашування визначали за досягнення продуктом титрованої кислотності 70 °T (Скоропадська 2014, Рибак 2014).

#### **Визначення реологічних характеристик кисломолочного продукту**

Дослід із визначення реологічних характеристик продукту було виконано за допомогою ротаційного віскозиметра «RHEOTEST II» за використання вимірювальної системи циліндр-циліндр (S/S<sub>3</sub>). Було внесено по 30 см<sup>3</sup> згустків отриманих кисломолочних продуктів до простору між двома вимірювальними циліндрами, один з яких нерухомий, а інший обертається внаслідок дії ротора. Швидкість обертання ротора та сила опору цьому обертанню були ключовими значеннями для визначення реологічних характеристик. Для їх обчислення було зроблено ряд переведень показників приладу, зокрема за формулою, показаною нижче, отримано напруження зсуву:

$$\tau = Z \cdot \alpha,$$

де  $\tau$  – напруження зсуву, Па;

$\alpha$  – показники приладу;

$Z$  – константа циліндра, Па/од. шкали приладу. Для S/S<sub>3</sub>  $Z$  становить 7,75.

Значення напруження зсуву підставили у формулу для визначення ефективної в'язкості:

$$\eta_{\text{еф}} = \tau / D_r \cdot 100,$$

де  $\eta_{\text{еф}}$  – ефективна в'язкість, МПа·с

$\tau$  – напруження зсуву, Па

$D_r$  – граничне напруження зсуву, Па<sup>2</sup>/с.  $D_r$  – стала, що відрізняється для кожного режиму

Частоту обертання ротора приладу використано для розрахунку кутової швидкості обертання внутрішнього циліндра:

$$\omega = 2 \pi R_B N,$$

де  $\omega$  – відносна кутова швидкість, м/с

$R_B$  – радіус внутрішнього циліндра

$N$  – частота обертання ротора, с<sup>-1</sup>.

Криву текучості руйнування згустку побудовано на основі залежності:

$$\eta_{\text{еф}} = B \omega^{-m},$$

де  $B$  – коефіцієнт, що дорівнює значенню ефективної в'язкості за кутової швидкості 1 м/с;

$m$  – показник інтенсивності руйнування структури матеріалу, що досліджується.

### **Визначення тиксотропності**

Тиксотропність – здатність речовини повертати вихідну структуру після механічного впливу. Визначення було проведено згідно зі значеннями ефективної в'язкості згустку сквашеного молока (Косой 2010). Згустки було зруйновано за допомогою п'ятиразового перемішування з однаковим режимом для всіх

досліджуваних зразків. Згодом зразки витримували за температури  $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$  та після 2 годин витримки вимірювали ефективну в'язкість повторно.

### **Визначення вологоутримувальної здатності**

Вологоутримувальна здатність – здатність речовин до утримування води. Для її визначення обрано метод центрифугування. Згусток кисломолочного продукту було перемішано задля отримання однорідної консистенції та внесено до трьох мірних колб по  $10\text{ см}^3$ . Згодом зразки витримано в умовах водяної бані ( $30\text{--}35^{\circ}\text{C}$ ) 10 хвилин та відцентрифуговано 5 хв за частоти  $1000\text{об/хв}$ . Шкала пробірки була інструментом оцінки кількості відділеної сироватки. Кінцевим результатом слугувало середнє значення кількості сироватки ( $\text{см}^3$ ), отримане із трьох зразків. Ці значення підставляли у формулу, з якої отримували значення вологоутримувальної здатності у відсотках за формулою:

$$\text{ВУЗ} = (1 - a/v) \cdot 100,$$

де ВУЗ – вологоутримувальна здатність продукту, %; а, в – маса сироватки та кисломолочного продукту відповідно (Скорченко 2007, Потемська 2016).

### **Оцінка виживаності культур**

У дослідях із оцінки виживаності було визначено кількість клітин за допомогою приготування послідовних розведень, висівання на середовищі МРС-агар та подальшого підрахунку колоній. Для підрахунку кількості КУО використовували чашковий метод Коха (Ващенко 2008).

### **Методика проведення дослідів із тривалого зберігання препарату за низьких температур**

Пепарат було приготовано із асоціації пробітичних культур, частину з яких змішували із сорбентом «Ентеросгель», іншу – із «Токсин.NET». Обидва сорбенти випускаються у формі гідрогелю та відрізняються наявністю інуліну у складі другого препарату. Змішування проводили у співвідношенні 10 частин сорбенту до 1 частини культуральної рідини. Після проведення іммобілізації зразки висушили у ліофільній сушарці та залишили для збереження за температури  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ліофілізат зберігався упродовж шести місяців, після чого були проведені такі досліді: було приготовано ряд розведень (до  $10^{-10}$ ) із фізіологічним розчином для кожного сорбенту окремо, які в подальшому висівали на тверде поживне середовище ГА для культивування. Зразки із розведеннями  $10^{-3}$ - $10^{-10}$  висівали по 1 см<sup>3</sup> у чашки Петрі, попередньо додавши до них неоміцин задля забезпечення селективного росту біфідобактерій. Зразки із тими самими розведеннями ( $10^{-3}$ - $10^{-10}$ ) також висівали по 1 мл у пробірки із поживним середовищем ГМ задля виявлення росту молочнокислих бактерій. Зразки було поміщено в термостатну шафу за температури 30° (по 4 чашки і 4 пробірки для кожного типу сорбенту) та 55°C (у тій самій кількості). Такі маніпуляції проводили впродовж 8 діб задля оцінки збережності зразків у динаміці.

### **Підготовка та аналіз зображень**

Фрактальна геометрія як сучасна галузь прикладної математики та основа всіх фрактальних ідей розроблялась як нова геометрія природи. Вона була винайдена Бенуа Б. Мандельбротом (Mandelbrot 2004) після його великої роботи, що описує складність форм і процесів, що зустрічаються в природі. Фрактальний аналіз застосовується для комплексного морфометричного дослідження об'єктів, що мають властивості фракталів – самоподібність і масштабну інваріантність: фрактал в цілому в точності або наближено збігається з частиною себе самого; збільшення масштабу зображення фрактала не веде до спрощення його структури (Mandelbrot 2004, Исаева 2004). З того часу, як Мандельбротом було відкрите поняття фракталу, вченими було проведено ряд досліджень, у яких наведено приклади фізичних, а не математичних фракталів, тобто тих, що зустрічаються у природі та не мають настільки точні закономірності, як математичні (Исаева 2004).

Як основну характеристику зображень було обрано фрактальну розмірність, що, використовуючи правило масштабування,  $N=AC^{-D_B}$ , розраховується із відношення логарифму кількості нових деталей  $N$ , до логарифму масштабу  $C$

$$D = \lim_{c \rightarrow 0} \left[ \frac{\ln N_c}{\ln C^{-1}} \right]$$

Першим кроком перед аналізом зображень було визначення похибки вимірювань методу. Було перевірено стандартні фрактальні зображення та порівняно їхні фрактальні розмірності, із теоретично відомими, що становлять 1,2618 та 1,585 для сніжинки Коха та трикутника Серпинського відповідно.

Додатковою характеристикою взято лакунарність, яку також визнано досить важливим показником при аналізі зображень мікроглії мозку (A. J. Karperien 2011). Лакунарність є мірою неоднорідності, що також враховує поступальну та обертальну інваріантність. Тобто зображення із малою кількістю пустот та низькою обертальною дисперсією характеризуватиметься малим значенням лакунарності, та, відповідно, інтерпретуватиметься як більш однорідне.

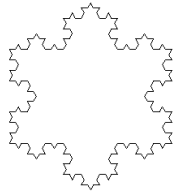
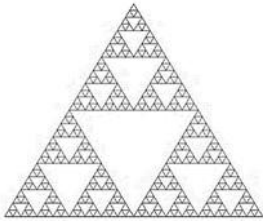
Задля виконання аналізу зображення було оброблено вручну за допомогою обраного програмного забезпечення (ImageJ) за допомогою зміни яскравості та контрастності. Після доведення якості зображення до задовільної, його приведено до бінарної (чорно-білої) форми та виконано фрактальний аналіз за допомогою програми FracLac методом «Box counting» із використанням стандартних налаштувань (Рис .2.7) (Karperien 2013) .

### **Перевірка потенційної можливості пробіотичних штамів до продукування БМН**

Через отримання даних утворення псевдофрактальних структур пробіотичних мікроорганізмів під впливом магнітного поля було вирішено перевірити потенційну можливість досліджуваних штамів до продукування біомагнітних наночастинок. Таку перевірку було здійснено за допомогою програми BLAST, власником якої є NCBI – Національний центр біотехнологічної інформації (Beck 2013).



Таблиця 2.1 – Результати визначення похибки виміру фрактальної розмірності

Досліджувані зображення	Теоретичне значення фрактальної розмірності D	Практичне значення фрактальної розмірності D	Відносна похибка виміру, %
	1,2618	1,2692	0,6
	1,585	1,5493	2,25

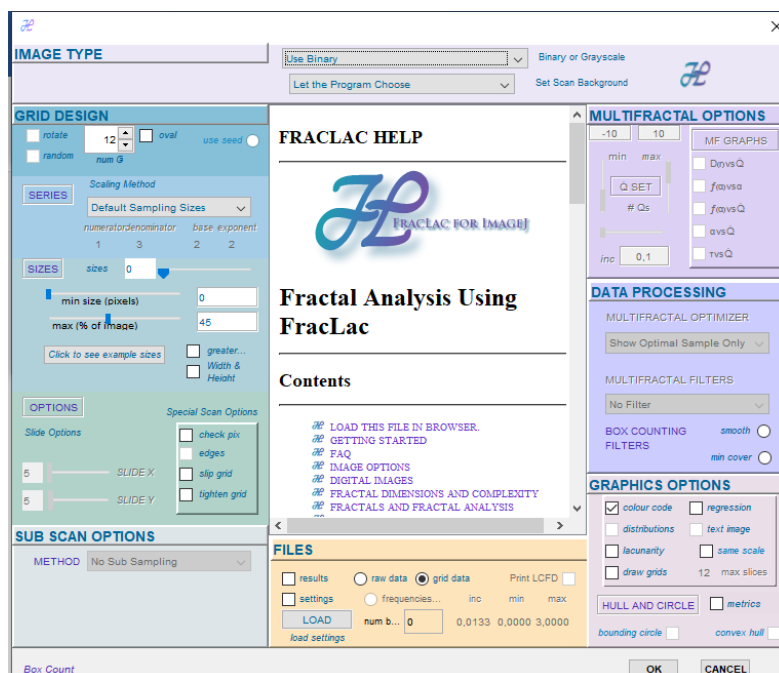


Рисунок 2.7 – Налаштування фрактального аналізу за використання плагіну FracLac програми ImageJ (Jelinek 2005), що були використані у дослідженні.

Основний інструмент пошуку локального вирівнювання (BLAST) – це програма пошуку схожості послідовностей, яку можна використовувати через веб-інтерфейс або як самостійний інструмент для порівняння запиту користувача з базою даних послідовностей. Кілька варіантів BLAST порівнюють усі комбінації запитів нуклеотидів або білків з базами даних нуклеотидів або білків. BLAST – це програма, яка знаходить локальні збіги між двома послідовностями та починає вирівнювання саме із цих точок. Додатково до вирівнювання, BLAST надає статистичну інформацію про вирівнювання: показує, чи є значення випадковими (Johnson 2008).

Головними показниками порівняння при обробці результатів вирівнювання є такі:

1. Ident (%) позначає кількість залишків нуклеотидів або амінокислот, які збігаються при проведенні вирівнювання двох послідовностей. Інтерпретують ці дані таким чином:

- Значення Ident більше 45% вказує на значну схожість структури та функцій послідовностей;
- Ident 25-45% означає незначну подібність структури послідовностей, однак велику схожість у фолдингу, що є причиною не виключеної гомології;
- При значеннях, що знаходяться в межах 18-24% гомологія допустима, однак цей проміжок також називають сумнівною зоною («twilight zone»), тому дані необхідно ретельно перевіряти на практиці (Li 2000).

2. E-value (E-число) – це параметр, який описує кількість випадкових результатів, які можна “очікувати” побачити при пошуку бази даних певного розміру. Він експоненційно зменшується з оцінкою (S), яка присвоюється збігу між двома послідовностями. По суті, це значення описує випадковий фоновий шум, який існує для збігів між послідовностями. Чим більше таких збігів знайдено, тим меншим є значення E-value, тобто тим вірогідніше збіги у нуклеотидних чи

амінокислотних послідовностях мають не випадковий характер (Bhagwat 2007). Нижче наведено таблицю, що дає змогу інтерпретувати значення E-числа.

3. Querycover чи Q (%) – дана характеристика відповідає за ступінь перекривання послідовностей, виражена у відсотках. Показує, наскільки білок з відомими властивостями покривається новим, знайденим за допомогою програми, пептидом.

Таблиця 2.2 – Розшифрування даних E-value (Li 2000)

діапазон значень E-value	Інтерпретація
$\leq 10^{-10}$	Послідовності є гомологічними повністю
$10^{-10} - 10^{-5}$	Гомологія вірогідна
$\geq 0,05$	Виявлені збіги можуть мати характер випадкових

Порівняння білків пробіотичних бактерій проводили із протеомом магнітотаксисного мікроорганізму *M. gryphiswaldense* MSR-1, для якого характерна наявність білків біомінералізації.

Нами було обрано наступні параметри вирівнювання, засновані на літературних даних (Горобець 2017):

**BLAST** Search database Non-redundant protein sequences (nr) using Blastp (protein-protein BLAST)  
☐ Show results in a new window

**Algorithm parameters** Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow and marked with ♦ sign

**General Parameters**

Max target sequences: 100 ▼  
 Select the maximum number of aligned sequences to display ⓘ

Short queries: ☒ Automatically adjust parameters for short input sequences ⓘ

Expect threshold: ♦ 1000 ⓘ

Word size: ♦ 3 ⓘ

Max matches in a query range: 0 ⓘ

**Scoring Parameters**

Matrix: ♦ BLOSUM45 ⓘ

Gap Costs: Existence: 15 Extension: 2 ⓘ

Compositional adjustments: Conditional compositional score matrix adjustment ⓘ

**Filters and Masking**

Filter: ☐ Low complexity regions ⓘ

Mask: ☐ Mask for lookup table only ⓘ  
☐ Mask lower case letters ⓘ

**BLAST** Search database Non-redundant protein sequences (nr) using Blastp (protein-protein BLAST)  
☐ Show results in a new window

Рисунок 2.8 Налаштування програми BLAST, використані у дослідженні (Горобець 2017)

### 3 РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1 Вплив іммобілізації пробіотичних культур *B. longum* і *S. thermophilus* на їх виживаність

На першому етапі досліджень було проведено іммобілізацію чистої культури *S. thermophilus* із сорбентами «Ентеросгель» та Силлард П та зроблено мікрофотографії отриманих зразків за допомогою мікроскопу за збільшення  $\times 400$  (рис. 3.1a, 3.2a). Після проведення ліофільної сушки тих самих зразків також приготовано препарати, що вивчали під мікроскопом за збільшення  $\times 1000$  (рис. 3.1b, 3.2b).

Із поданих зображень видно прикріплені до агрегатів частинок сорбенту клітини *S. thermophilus*, на відміну від контрольної суспензії, в якій клітини розсереджені. Зокрема на фото за збільшення  $\times 1000$  (рис. 3.1b) чітко видно, що клітини огортають агрегати Силларду П по їх контуру, водночас як в контрольному зразку суспензії після ліофільної сушки клітини висохли грудочками. Це частково пояснює суттєве зменшення числа колоній, які вирости на твердому середовищі (в дослідженні виживаності). Мікроорганізми, що були іммобілізовані на препараті «Ентеросгель» (рис. 3.2), мали суттєво інший вигляд, а саме: клітини покриваються гідрогелем і висихають разом з ним, що наводить на припущення про їх включення до структури гідрогелю.

В рамках дослідження можливості створення комплексних закваскових препаратів кокову (*S. thermophilus*) та паличкову (*B. longum*) культури було перевірено на життєздатність, результати представлено в таблиці 3.1.

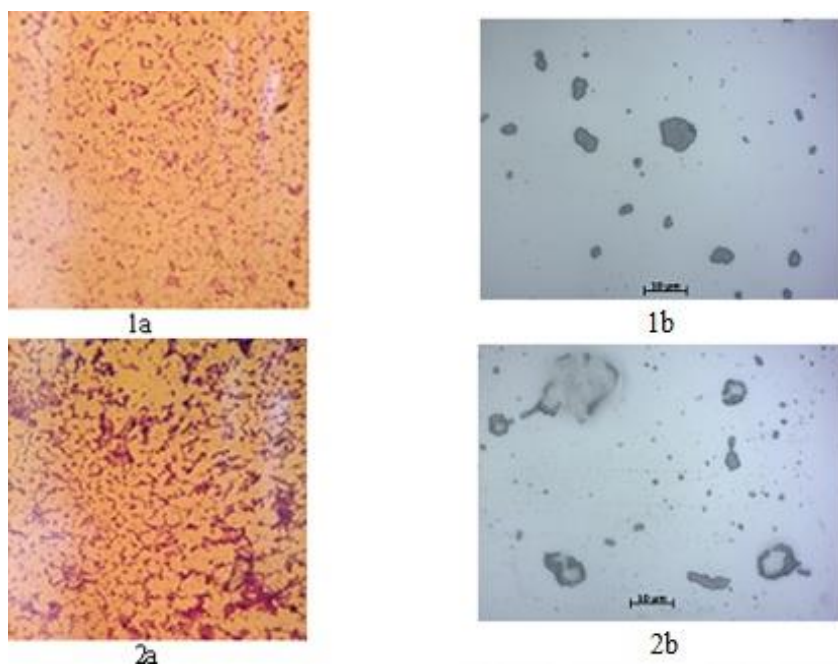


Рисунок 3.1 – 1a: контроль за збільшення, x400, 1b: ліофільно висушений препарат за збільшення x1000; 2a: пробіотична культура після іммобілізації на агрегатах Силард II, x400, 2b: ліофільно висушений препарат за збільшення x1000.

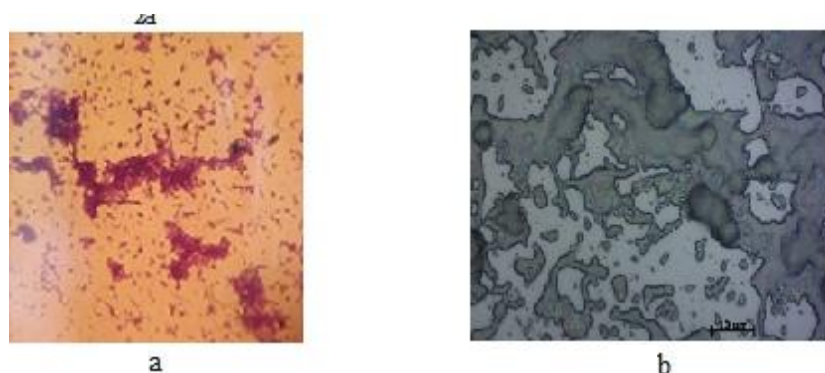


Рисунок 3.2 – а: суспензія після іммобілізації з Ентеросгелем, x400; б – ліофільно висушений комплекс клітин з Ентеросгелем, x1000.

З попередніх досліджень було з'ясовано, що виживаність іммобілізованих клітин (*L. plantarum*) падала, що може бути пов'язано з певним пошкодженням клітин в процесі перемішування, а також ефектів впливу дрібних частинок на клітинну стінку. Наші дослідження з культурами *S. thermophilus* та *B. longum* підтвердили ці результати, зокрема щодо впливу сорбенту на виживаність клітин.

В дослідях із ліофілізації було встановлено, що внаслідок ліофільної сушки виживаність іммобілізованих клітин на гідрогелі метилкремнієвої кислоти (іммобілізація з Ентеросгелем) знижувалася лише на один порядок, у той час як на сухому пірогенному порошку (Силлард П) різниця у кількості життєздатних колоній сягала двох порядків. Це може бути пояснено хімічною структурою сорбенту: Ентеросгель має модифіковану гідрофобну структуру, обумовлену введенням метильних груп.

Таблиця 3.1– Збережність пробіотичних штамів у процесі ліофілізації

Вид препарату	Біомаса перед ліофілізацією, lgN, КУО/г	Біомаса після ліофілізації lgN, КУО/г	Вживаність, %
<i>B. longum</i> (контроль)	9,8±0,3	9,6±0,3	98,9
<i>B. longum</i> (препарат з гідрогелем)	8,6±0,2	7,6±0,2	88,3
<i>B. longum</i> (препарат з піропорошком)	9,5±0,3	6,8±0,2	71,8
<i>S. thermophilus</i> (контроль)	9,4±0,1	9,1±0,3	97,3
<i>S. thermophilus</i> (препарат з гідрогелем)	8,8±0,3	7,6±0,1	86,1
<i>S. thermophilus</i> (препарат з піропорошком)	9,04±0,3	6,2±0,3	68,8

Отже, встановлено, що іммобілізація різних форм пробіотичних культур (паличок і коків) на гідрогелі метилкремнієвій кислоті спричиняла меншу загибель клітин, ніж на пірогенному сухому порошку. Виживаність ліофільно висушених препаратів (із додаванням захисного середовища) з Ентеросгелем падала на порядок, водночас як препаратів з пірогелем – не 2 порядки.

Тому подальші дослідження проводили з гідрогелем.

### 3.3 Вплив модельованих кислих умов шлунково-кишкового тракту на виживаність комплексних препаратів пробіотичних штамів

Задля перевірки препарату в умовах, наближених до тих, що наявні в шлунково-кишковому тракті (ШКТ), за методикою (Вокс 2010) було проведено оцінку кислотостійкості культур *in vitro* із додаванням до зразків розчинів хлороводню. Оцінку стійкості також виконували підрахунком кількості колоніє утворювальних одиниць (КУО) на твердому середовищі, що вижили внаслідок витримки у розчині.

Результати представлено на рисунку 3.3.

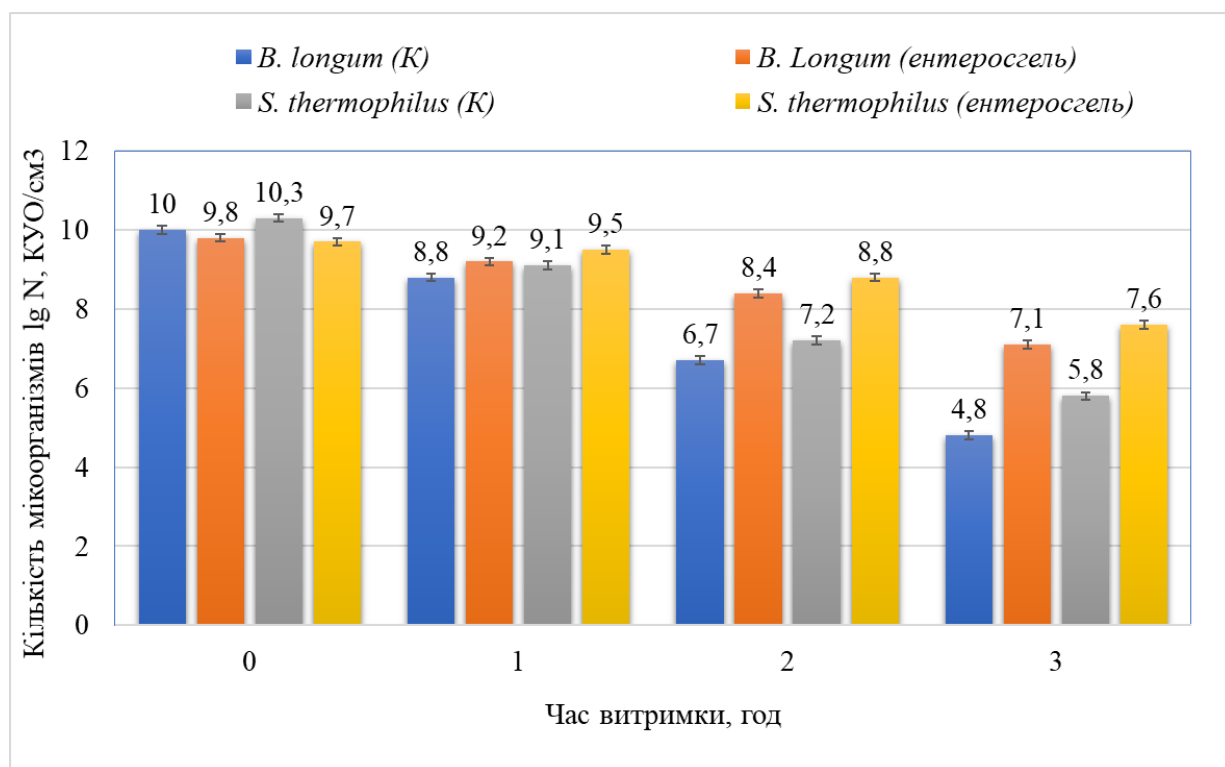


Рисунок 3.3 – Зміна кількості життєздатних клітин пробіотичних штамів *S. thermophilus* та *B. longum* у разі витримки за рН2,2 впродовж 1-3 годин

Одержані результати свідчать, комплексні препарати (іммобілізовані на Ентеросгелі) краще витримували кислотний тест, що особливо помітно з подовженням часу витримки.



Ця тенденція характерна як для культури *S. thermophilus*, так і *B. longum*.

Однак, помітно також, що кількість життєздатних клітин мікроорганізмів, виявилася вища у штаму *S. thermophilus*. Ця тенденція спостерігалася як для контрольного, так і для дослідного зразків. Так, для цієї культури спостерігалось зниження кількості клітин з lg 10,3 до lg 5,8 для контролю та із lg 9,7 до lg 7,6 у досліді із препаратом «Ентеросгель». *B. longum* був менш стійким до дії соляної кислоти, для цього штаму кількість життєздатних клітин та його кінцевими показниками були lg 4,8 для контролю та lg 7,1 для досліді.

Отже, іммобілізація клітин з препаратом «Ентеросгель» спричиняла їх кращу виживаність у разі суттєвого зниження рН (до 2,2), тому можна стверджувати, що створення комплексних препаратів пробіотичних культур з гідрогелем метилкремнієвої кислоти сприяє кислотостійкості мікроорганізмів, які рухаються по ШКТ у напрямку кишечника.

### **3.4 Вплив тривалого зберігання за низьких температур на виживаність клітин у складі препарату**

Подальшим етапом експериментів стало дослідження виживаності пробіотичного препарату, що зберігався у морозильній камері. Подобові дослідження витримування за підвищених температур (30 °C і 55 °C) моделювали умови довгострокового зберігання. Результати представлено в табл.3.1.

Бачимо, що зразки з використанням сорбенту «Токсин.NET» мали кращу виживаність клітин. Можливим поясненням цього є один із компонентів сорбенту – інουλін, що наявний у препараті як пребіотик, однак може виступати як в ролі ксеропротектора, так і виконувати своє основне призначення, тобто слугувати живленням для мікроорганізмів. За додавання цього типу сорбенту клітини виживали навіть на восьму добу, однак їх кількість значно знижувалася (на 3 порядки порівняно нульовою точкою). Отже, в подальших дослідженнях необхідно підібрати ксеропротектор та його дозування.

Таблиця 3.1 – Кількість КУО за культивування іммобілізованих висушених та заморожених пробіотичних зразків

Середовище культивування	К-сть КУО у зразках із додаванням препарату «Ентеросгель»		К-сть КУО у зразках із додаванням препарату «Токсин.NET»	
0 –ва точка(15.09.2020)				
Температура	37°С			
ГА	6·10 <sup>7</sup>		2,8·10 <sup>8</sup>	
ГМ	4·10 <sup>8</sup>		4,2·10 <sup>8</sup>	
1-ша доба(16.09.2020)				
Температура	55°С	30°С	55°С	30°С
ГА	1·10 <sup>6</sup>	4·10 <sup>7</sup>	1·10 <sup>7</sup>	2,8·10 <sup>8</sup>
ГМ	7·10 <sup>6</sup>	2·10 <sup>8</sup>	1·10 <sup>8</sup>	4,2·10 <sup>8</sup>
2-га доба(17.09.2020)				
ГА	1·10 <sup>4</sup>	1·10 <sup>7</sup>	1·10 <sup>6</sup>	1·10 <sup>8</sup>
ГМ	3·10 <sup>4</sup>	6·10 <sup>7</sup>	1·10 <sup>7</sup>	1·10 <sup>8</sup>
3-тя доба(18.09.2020)				
ГА	-	5·10 <sup>6</sup>	7·10 <sup>4</sup>	5·10 <sup>7</sup>
ГМ	-	6·10 <sup>6</sup>	9·10 <sup>4</sup>	1·10 <sup>7</sup>
6-та доба(21.09.2020)				
ГА	-	4·10 <sup>5</sup>	-	1,7·10 <sup>6</sup>
ГМ	-	2·10 <sup>5</sup>	-	1,5·10 <sup>6</sup>
7-ма доба(22.09.2020)				
ГА	-	7·10 <sup>3</sup>	-	7,4·10 <sup>5</sup>
ГМ	-	1·10 <sup>4</sup>	-	8,5·10 <sup>5</sup>
8-ма доба(23.09.2020)				
ГА	-	-	-	1,9·10 <sup>5</sup>
ГМ	-	-	-	2,5·10 <sup>5</sup>

### **3.4 Визначення реологічних та біотехнологічних показників кисломолочного продукту, сквашеного комплексною заквашувальною пробіотичною культурою**

Для оцінки функціонального стану іммобілізованої пробіотичної культури було проведено порівняльну характеристику кисломолочного продукту (йогурту), сквашеного за допомогою нативного (не іммобілізованого) штаму *Streptococcus thermophilus* препарату культури, іммобілізованої на гідрогелі метилкремнієвій кислоті, за рядом показників (рис. 3.4-3.5, табл.3.2).

Дозування препарату при виконанні дослідів було однаковим для обох зразків та складало 1 г/л. Отримання кисломолочного продукту за допомогою іммобілізованої в препарат «Ентеросгель» пробіотичної культури показало функціональність такого комплексного препарату, тобто його здатність, як заквашувальної культури.

За допомогою віскозиметра “RHEOTEST II” з вимірювальною системою циліндр-циліндр (S/S<sub>3</sub>) було проведено реологічний аналіз отриманого продукту та побудовано криві руйнування згустку молока (рис. 3.4), а також криві текучості (рис. 3.5) досліджуваних зразків.

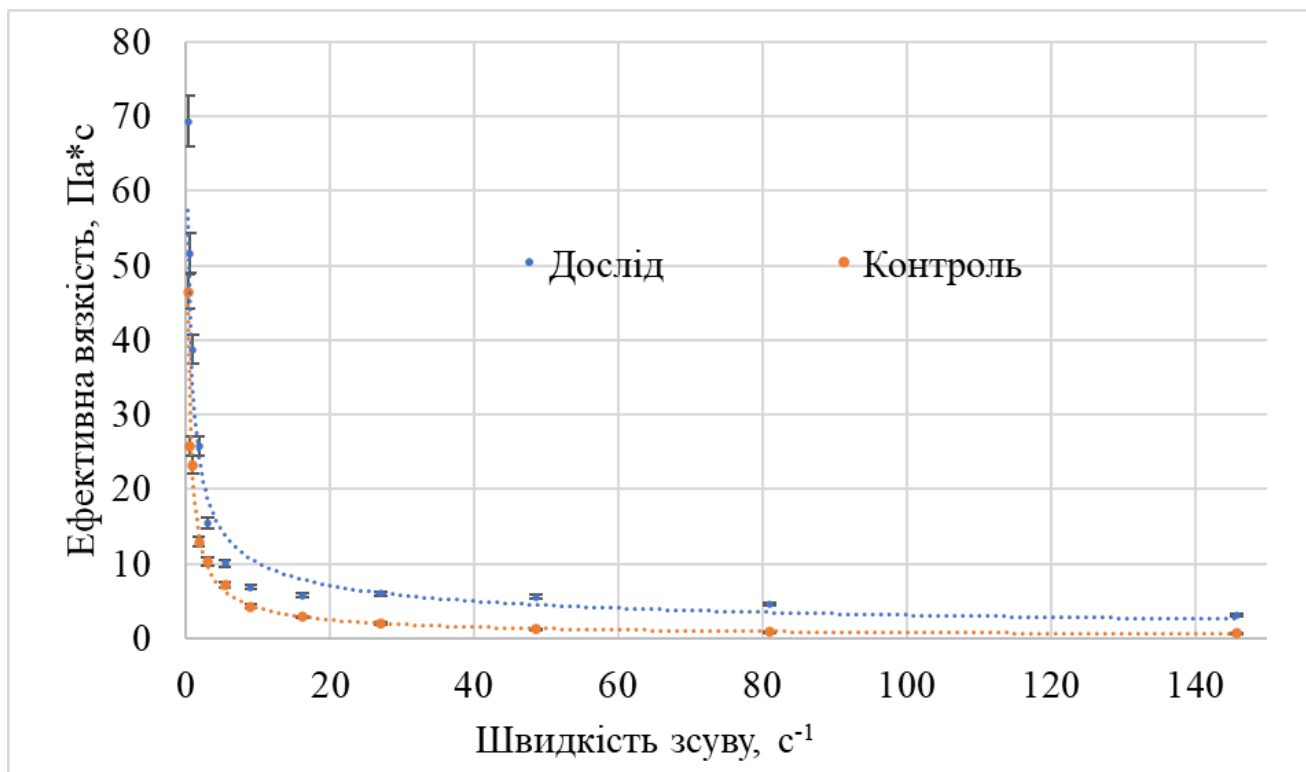
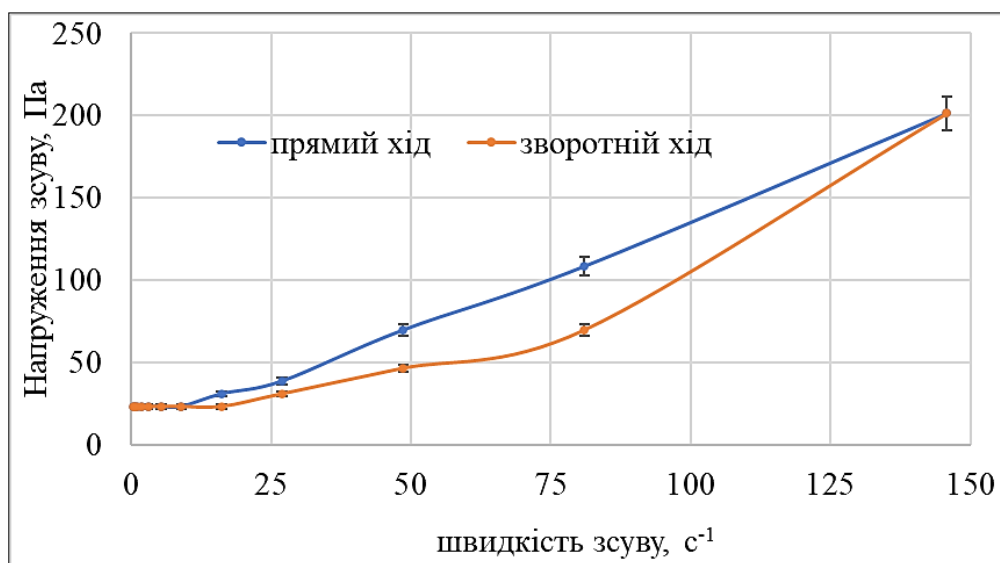


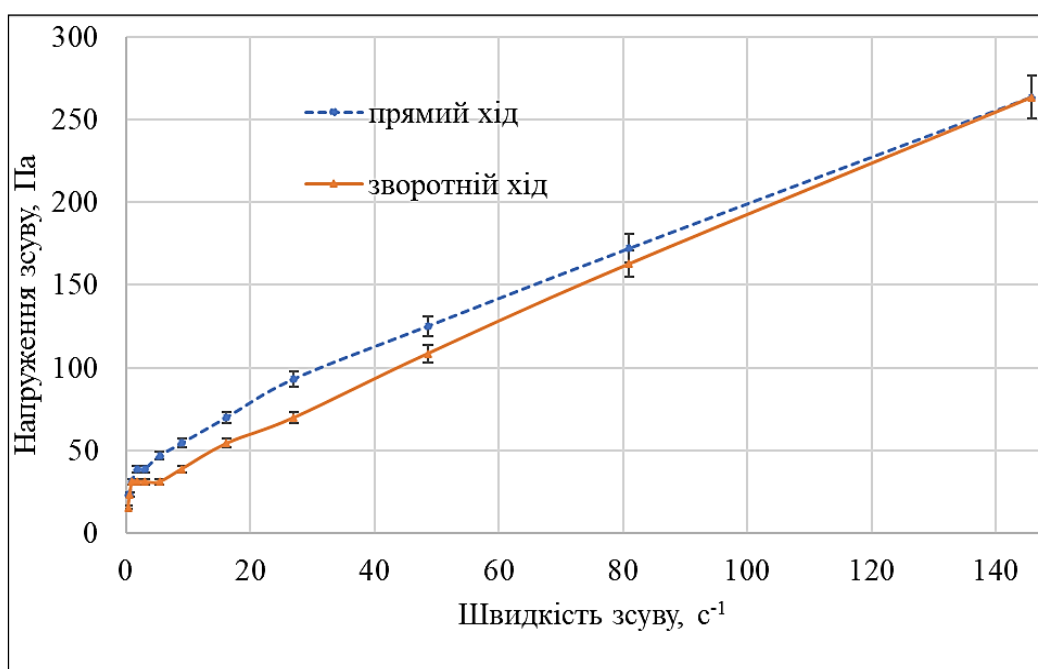
Рисунок 3.4 – Криві руйнування згустку молока, сквашеного імобілізованою (дослід) та вільною (контроль) культурою *S.thermophilus*.

Із графіка видно, що зменшення ефективної в'язкості для дослідного зразка за збільшення швидкості зсуву відбувалося дещо повільніше. Це свідчить про більшу реологічну стійкість в'язкість згустку молока, сквашеного імобілізованою в «Ентеросгель» культурою, тобто має кращі споживчі властивості.

Наступним аналізом тиксотропності, тобто здатності до відновлення структури після механічного впливу, було з'ясування впливу швидкості зсуву на напруження зсуву у разі збільшення та зменшення швидкості зсуву. Криві текучості для утвореного згустку показано на рис.3.5.



а



б

Рисунок 3.5 – Криві текучості згустку молока: а – сквашеного іммобілізованою культурою *S. thermophilus*, б – сквашеного неіммобілізованою культурою *S. thermophilus*

За різницею ширини «петлі гістерезису» на графіках текучості можна судити про утворення пластичного та щільного згустку кисломолочного продукту,

сквашеного іммобілізованою культурою *S. thermophilus*. Отже, йогурт, утворений іммобілізованою заквашувальною культурою, показав кращу стійкість до механічного впливу та здатність до кращого відновлення у разі зняття деформаційних впливів, що є перевагою для збереження структури у процесі транспортування та зберігання продукту.

Інші тести отриманого продукту представлено в таблиці 3.2.

Показано, що досліджуваний кисломолочний продукт на основі іммобілізованої культури *S.thermophilus* характеризується показниками, притаманними нормальному продукту. Так, він мав нормальний кисломолочний запах та смак, а згусток молока був в'язким та щільним.

Культура не втрачала здатності до розвитку як за присутності 30 % жовчі, так і за наявності 6,5 % NaCl, що важливо для позиціонування кисломолочних продуктів, сквашених іммобілізованим заквашувальним препаратом, як корисних для здоров'я.

Тим не менше, тривалість процесу дещо підвищилася – на 1,5-2 год –через зменшення КУО внаслідок іммобілізації та меншої кількості мікроорганізмів за того самого дозування, що й заквашування не іммобілізованою культурою. Гранична кислотність була незначно (на 0,5 меншою на 5°Т), а активна, відповідно, більшою – на 0,5 од.

Однак, враховуючи ряд інших ефектів, закваску на основі іммобілізованого *S.thermophilus* можна вважати придатною для використання у харчовій промисловості.

Таблиця 3.3 – порівняльна характеристика кисломолочних продуктів, виготовлених за допомогою заквасок іммобілізованого та неіммобілізованого штамів *S. thermophilus*

Показник	Значення кисломолочного продукту, сквашеного	
	за допомогою <i>S. thermophilus</i> неіммобілізованого	за допомогою <i>S. thermophilus</i> іммобілізованого
Розвиток за присутності жовчі 30 %	+	+
Розвиток за присутності NaCl 6,5%	+	+
Тривалість сквашування молока, год	6,5-7,0	8-9
Гранична кислотність готового продукту, °T	100±5	95±5
Активна кислотність готового продукту після 14 діб зберігання, од. рН	4,3±0,1	4,7±0,1
Ефективна в'язкість кисломолочного згустку (t=20°C), мПа.с	23,4±1,2	32,44±1,45
Органолептичні показники (наявність характерного кисломолочного смаку та запаху, типової консистенції)	Чистий кисломолочний смак та запах, щільна та в'язка консистенція	Чистий кисломолочний смак та запах, щільна та в'язка консистенція

### 3.5 Фрактальний аналіз зображень, отриманих після дії МП на суспензії пробіотичних культур

Для інтенсифікації іммобілізації пробіотичних культур з кремнеземом було запропоновано застосовувати магнітне поле (МП). Але такі дослідження не було проведено, натомість змодельовано взаємодію клітин з поверхнею «сонячного» кремнію, тобто кремнію, проводимість якого обумовлена р-типом провідності

(дірковою). Отже, для такого типу кремнію акцепторами електронів можуть виступати домішки елементів III групи, наприклад, бор або алюміній та інші.

Для контрольних експериментів було приготовано суспензію із асоціації 2 культур: паличковидної (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) та коковидної (*Streptococcus thermophilus*) та зроблено їх розведення у фізіологічному розчині до  $10^{-3}$ . Краплі суспензії було нанесено за допомогою шприца на попередньо підготовані кремнієві пластинки та вміщено в магнітне поле із величиною індукції 0,01 Тл. Розведення було підібрано за допомогою візуальної оцінки мутності зразків, враховуючи попередні експерименти.

Так само готували зразки з самовільно висушених крапель на попередньо оброблених МП із величиною індукції 0,17 Тл кремнієвих пластинках.

Ту саму суспензію було змішано із «Ентеросгелем» у співвідношенні 10:1 (10 частин суспензії та одна частина сорбенту) і нанесено на кремнієву пластинку. Зразки суспензії з «Ентеросгелем» на кремнієвих пластинках було поміщено на магніт із індукцією 0,01 Тл на термін 10 діб. Також залишено самовільно висушені краплі контрольних зразків (суспензії нативних клітин і клітин з «Ентеросгелем») без впливу магнітного поля.

Отримані після самовільного висушування та зберігання в МП зразки роздивлялись і фотографували під мікроскопом, досліджуючи утворення структур, сформованих скупченнями клітин. Потім отримані зображення (не менше 10 шт. для кожного зразку) обробляли в програмі ImageJ (усуваючи артефакти, такі, як, наприклад, шкала розмірів) і за допомогою плагіну FracLac розраховували показник фрактальної розмірності та лакуарності візуально спостережуваних структур на мікрозображеннях.

Вибір обумовлений намаганням представити візуально спостережувані результати наочними числовими значеннями фрактальності (є так званою щільністю самоподібності, показує повноту заповнення простору фракталом у разі його збільшення) і лакуарності (міра неоднорідності, що також враховує



поступальну та обертальну інваріантність). Результати представлено на рис. 3.6, табл.3.4.

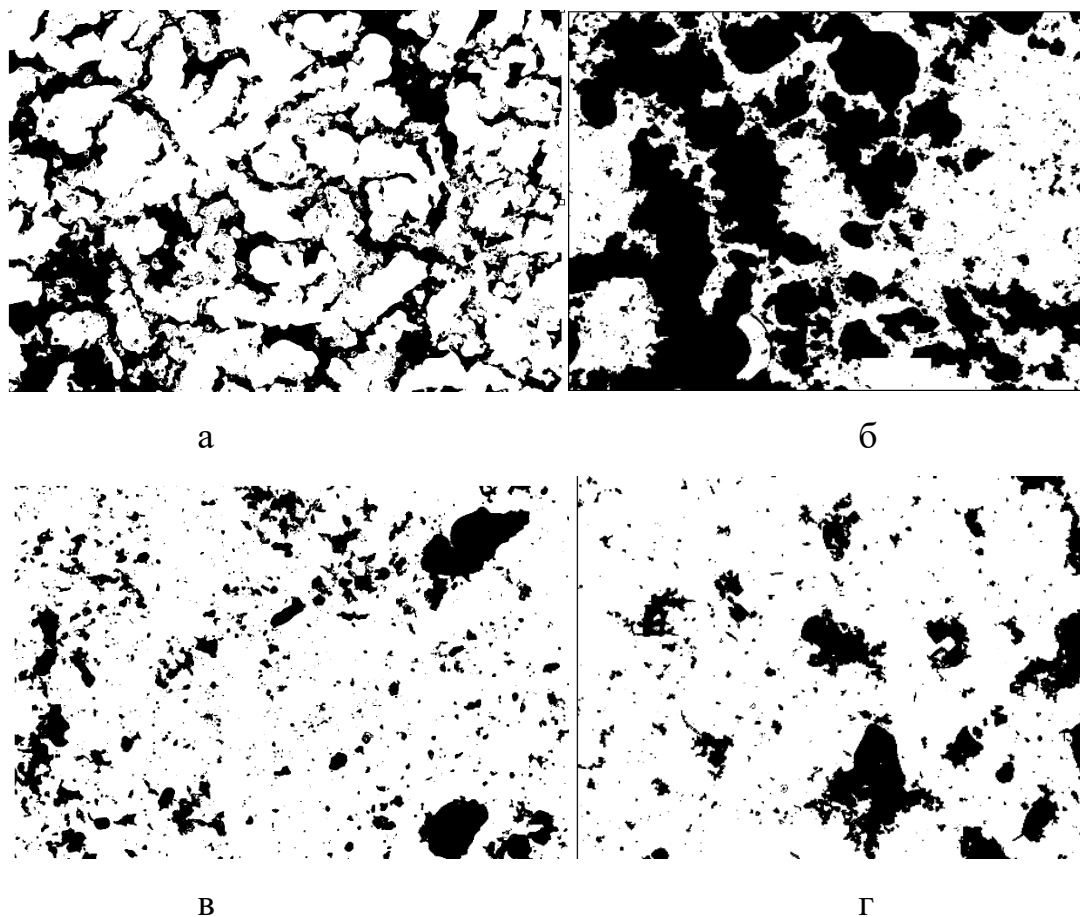


Рисунок 3.6а,б – Мікрозображення дослідних зразків змішаної культури *S. thermophilus* та *L. bulgaricus* на «Ентеросорбелі» під впливом магнітного поля індукцією 0,01 Тл за збільшення у 200 разів; в,г– контрольні зразки із сорбентом без впливу МП, збільшення у 200 разів.

Отримані структури іммобілізованих на гідрогеліметилкремнієвої кислоти клітин (рис. 3.6, табл. 3.4) здебільшого склалися із залишків частин поживного середовища та сорбенту. Однак спостерігалися також клітини під товщею середовища, що наводить на припущення, що мікроорганізми могли також брати участь у створенні структур. Через шар середовища було досить складно розгледіти

наявність клітин, тому подальші досліді проводили із якомога ретельнішим відмиванням клітин від середовища.

Незважаючи на це, для зразків із додаванням сорбенту (рис. 3.6) можна було візуально відрізнити не впорядковано розташовані клітини і залишки середовища та сорбенту (дослід із сорбентом без МП) від чітких структур, створених середовищем (дослід з сорбентом в слабкому МП). Результати із сорбентом по фрактальній розмірності і лакунарності (лакунарність знижувалась з 1,038 до 0,446 у разі перебування висушеної краплі у МП) обумовлені, здебільшого, утворенням дендритних структур, що складались із середовища. Але візуально було помітно, що в місцях відсутності середовища клітини із сорбентом розташовувались хаотично за даних значень статичного МП (0,01 Тл), що може свідчити про деструктивну роль сорбента в утворенні псевдофрактальних рисунків. Тому для уточнення нівелювання можливої взаємодії комплексу клітин з «Ентеросгелем» і кремнієвої поверхні дані дослідження необхідно повторити з ретельно відмитими клітинами.

Подальші досліді проводили з нативними клітинами (за присутності залишків культурального середовища), але з розведенням  $10^{-5}$ . Їх проведено аналогічним способом до попередніх, але без додаткового внесення змішування сорбенту із суспензією. Джерелом магнітного поля став постійний магніт, індукція якого складає 0,17 Тл. В процесі дослідження мікрозображень змінювали збільшення мікроскопу і окремо для кожного збільшення зображення готували й аналізували за допомогою програми ImageJ і плагіна FracLac.

Результати аналізу фрактальної розмірності (рис.3.7, табл. 3.4) нативних лактобацил (палички *L.bulgaricus*) на кремнієвій пластинці демонструють не досить значну різницю у значеннях фрактальної розмірності і лакунарності між контрольним та дослідним (крапля висихала у МП) зразками. Однак різниця була наявна, і наступні дослідження було проведено з кремнієвою пластиною, яка досить тривалий час перебувала у статичному МП.

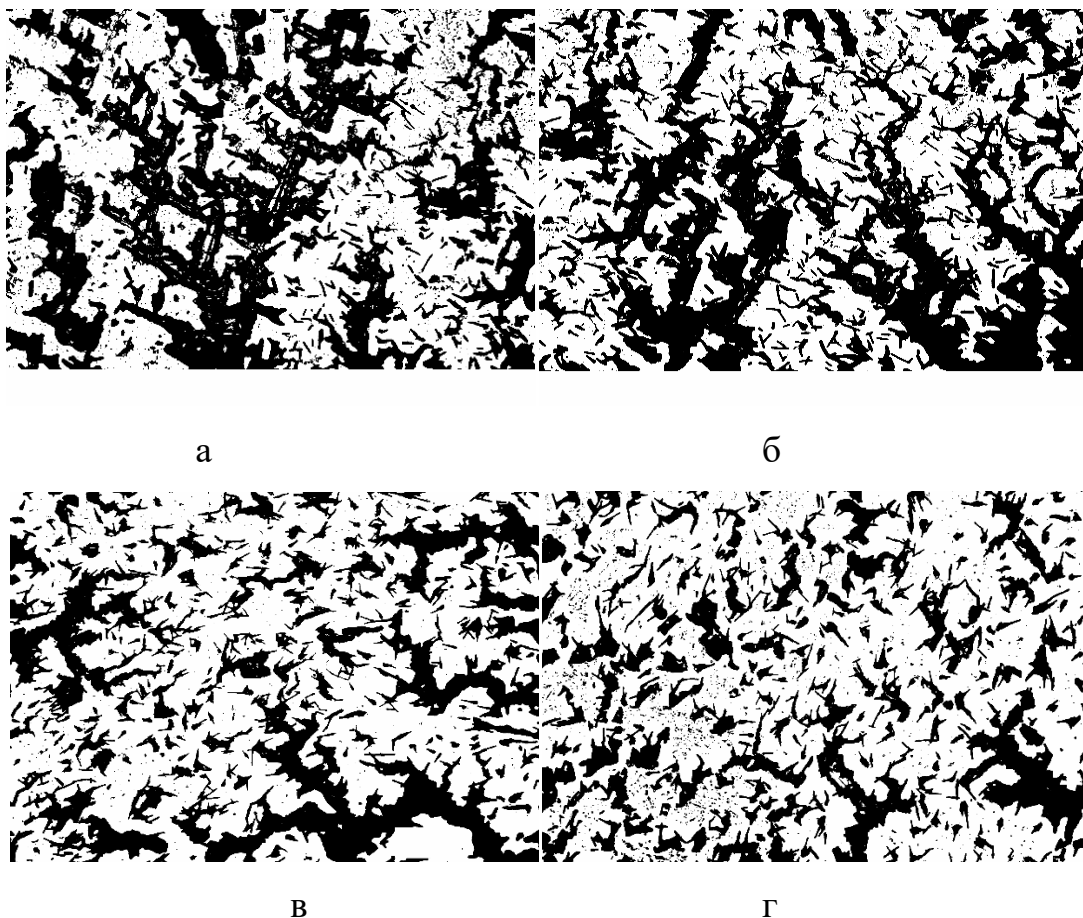


Рисунок 3.7а,б – мікрображення зразків паличок *L.bulgaricus* без додавання сорбенту під впливом магнітного поля індукцією 0,17 Тл за збільшення у 200 разів; в,г– контрольні зразки без додавання сорбенту та впливу МП, збільшення у 200 разів.

Для порівняння таке саме дослідження (без сорбенту) було проведено для рухливих водоростей *Chlamydomonas* 751, які протягом висихання краплі в МП мали змогу рухатись, і малорухливих *Chlamydomonas* 759 (табл.3.4).

Дослідження зразків з нерухливими водоростями не показали значимої різниці у контрольних зображеннях та вміщених у МП протягом висихання. Для рухливих було виявлено значне зменшення лакуарності для зразків, які самовільно протягом 20-30 хв висихали у статичному МП.

Таблиця 3.4 – Результати фрактального аналізу зразків пробіотичних штамів у порівнянні із водоростями роду *Chlamydomonas*

№	Вид зразку	Індукція МП, Тл	Середня фрактальна розмірність, D	Середня лакунарність, Λ
1	<i>Chlamydomonas</i> 751, 50х	0	1,779±0,001	0,538 ±0,021
2	<i>Chlamydomonas</i> 751, 50х	0,17	1,723±0,030	0,378±0,033
3	Палички та коки+ сорбент 200х	0	1,644±0,028	1,038±0,022
4	Палички та коки+ сорбент, 200х	0,01	1,740±0,027	0,446±0,039
5	Палички, без сорбенту, 200х	0	1,787±0,001	0,342±0,002
6	Палички, без сорбенту, 200х	0,17	1,828±0,003	0,312±0,011
7	Палички, без сорбенту, 500х	0	1,692±0,031	0,503±0,096
8	Палички, без сорбенту, 500х	0,17	1,782±0,029	0,459±0,094

Відмінність наступного дослідження полягала в тому, що ~~ане~~ краплі ретельно відмитої суспензії наносили на кремнієву пластину, яка до того досить тривалий час (до півроку) знаходилась у МП. Результати (рис.3.8, 3.9, табл. 3.5) демонструють досить малу різницю у фрактальній розмірності дослідного та контрольного зразків (що повторює результати з висиханням краплі у МП). Незважаючи на це, лакунарність відрізнялася значно (від 34% для збільшення у 200 разів до 67% – для збільшення 1000 разів), що свідчить про більшу впорядкованість досліджуваних зображень та наявність псевдофрактальних структур, утворених скупченнями клітин під дією магнітного поля. Для кокової культури спостерігалася така сама тенденція результатів.

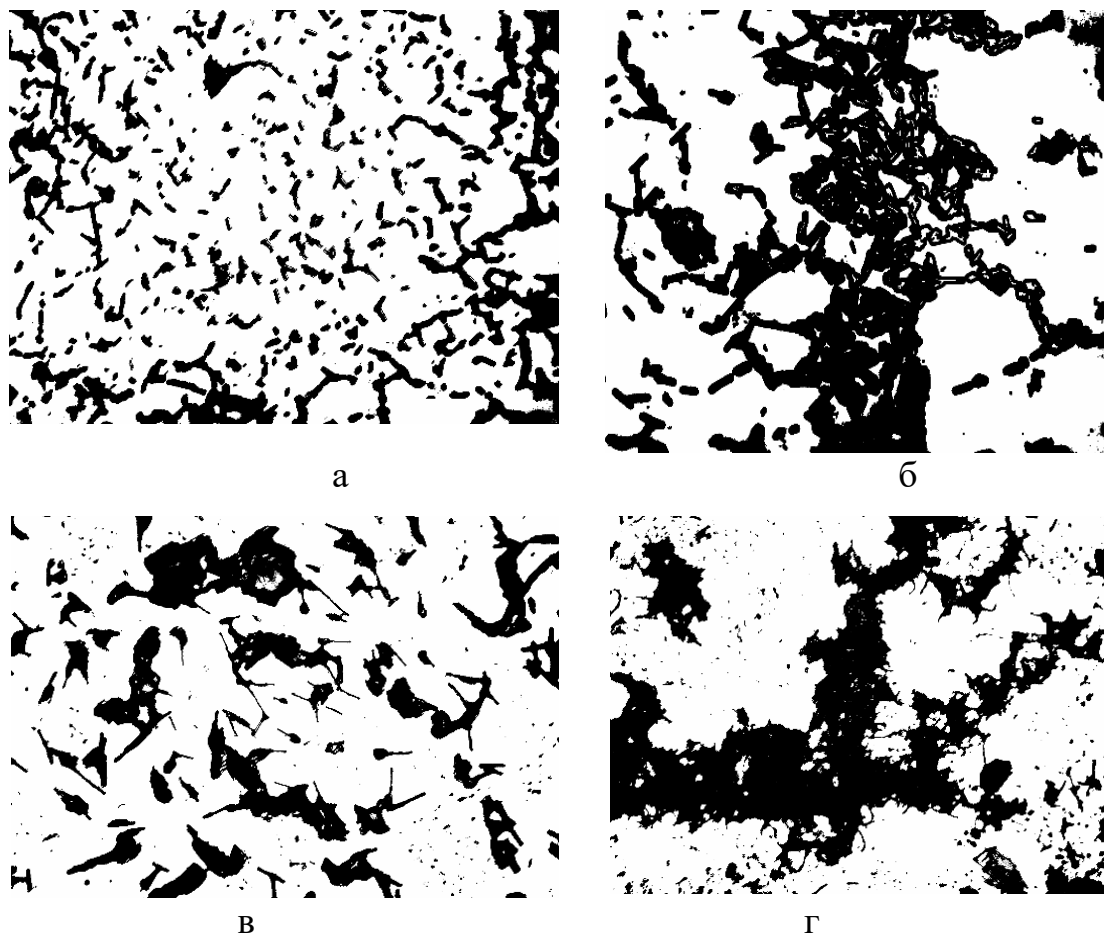


Рисунок 3.8 – Мікрозображення зразків *L. bulgaricus* за відсутності впливу магнітного поля на кремнієву пластинку за збільшень: а – у 200 разів; б – у 1000 разів; в,г – у 500 разів.

Отже, не беручись пояснювати фізичну сутність отриманих ефектів, можна припустити, що за тривалої дії МП на пластину «сонячного» кремнію р-типу провідності наявні певні взаємодії між клітинами пробіотичних культур і поверхнею цієї полірованої пластинки, які впливають на утворення впорядкованих структур. Такі рисунки можливо не тільки спостерігати візуально, але й продемонструвати таку структурованість за допомогою розрахунків параметрів фрактальної розмірності та лакуарності.

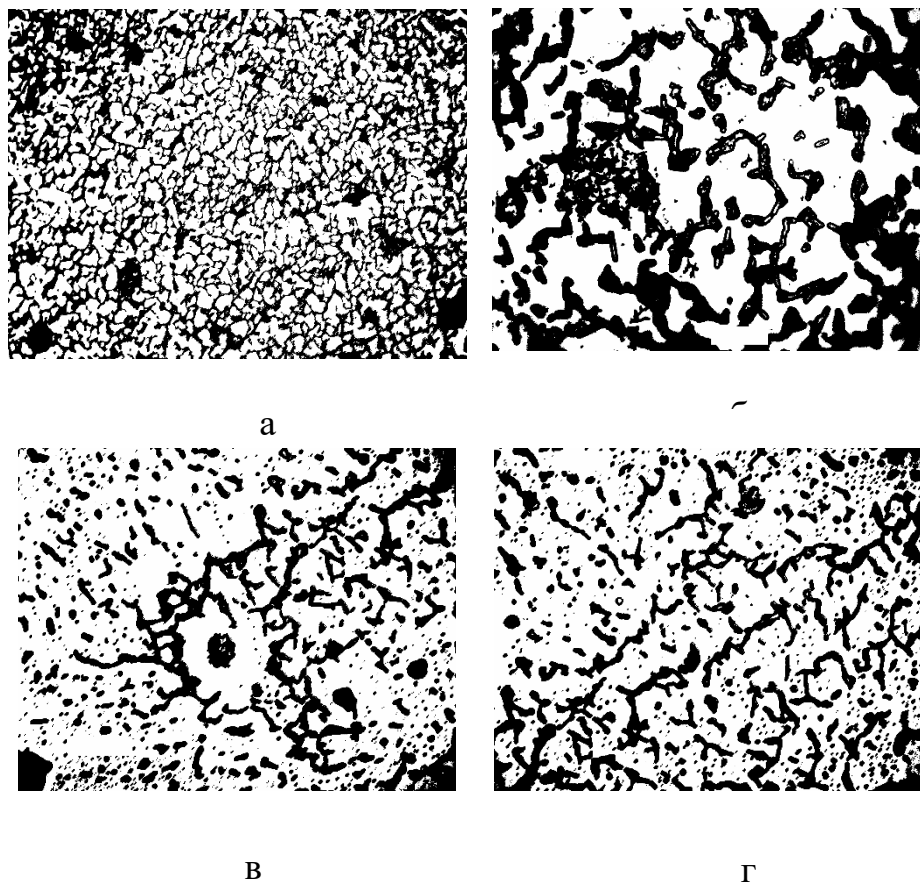


Рисунок 3.9 – Зразки *L. bulgaricus* за впливу магнітного поля індукцією 0,17 Тл за збільшень: а – у 200 разів; б – у 1000 разів; в,г – у 500 разів.

Таблиця 3.5 – Результати фрактального аналізу зразків *L. bulgaricus*

№	Назва мікроорганізму	Збільшення	Індукція МП, Тл	Середня фрактальна розмірність	Середня лакунарність, $\Delta$
1	<i>L. bulgaricus</i>	200x	0	$1,703 \pm 0,008$	$0,376 \pm 0,055$
2		200x	0,17	$1,832 \pm 0,005$	$0,195 \pm 0,005$
3		500x	0	$1,702 \pm 0,004$	$0,561 \pm 0,136$
4		500x	0,17	$1,781 \pm 0,013$	$0,371 \pm 0,077$
5		1000x	0	$1,720 \pm 0,014$	$0,577 \pm 0,044$
6		1000x	0,17	$1,786 \pm 0,017$	$0,195 \pm 0,005$

### 3.6 Перевірка потенційної можливості штамів до синтезу БМН методами порівняльної протеоміки

Задля перевірки потенційної можливості досліджуваних пробіотичних штамів до синтезу БМН та їхньої можливої взаємодії у МП було проведено вирівнювання білкових послідовностей (Gorobets 2014) протеомів цих штамів із основними білками біомінералізації, знайденими у *M. gryphiswaldense* MSR-1. Результати наведено у таблиці 3.11.

Із результатів можна зробити висновок, що усі досліджувані мікроорганізми мають потенційну можливість до продукування БМН, яку, однак, необхідно перевіряти експериментальним шляхом. До того ж, за наявності певних видів потенційних гомологів можна припустити, що *B. longum* та *S. thermophilus* схильні до потенційного синтезу внутрішньоклітинних аморфних БМН наночастинок, у той час як *L. bulgaricus* може продукувати внутрішньоклітинні кристалічні БМН.

Така властивість досліджуваних штамів дає змогу висловити припущення про роль БМН в утворенні структур та впорядкуванні розташування клітин про біотичних культур під час висихання краплі на кремнієвій пластині під час або після тривалого впливу статичного МП індукцією 0,17 Тл.

Таблиця 3.6 – Вирівнювання білків *M. gryphiswaldense* MSR-1 та білкових послідовностей досліджуваних пробіотичних штамів.

Штам мікроорганізму	Повно та геному	E-value					
		I (%)					
		MamA	MamB	MamM	MamO	MamE	MamK
<i>Streptococcus thermophilus</i>	●	0.44 (26,0)	1e-18 (26,2)	6e-22 (28,2)	3e-05 (24,5)	1e-27 (42,6)	6e-14 (28)
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	●	0.026 (27,1)	7e-09 (27,4)	9e-09 (24,7)	5e-08 (24,9)	1e-25 (42,3)	1e-13 (27,1)
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	●	23 (40)	8e-17 (27,05)	9e-13 (22,96)	3e-07 (26,2)	4e-26 (41,4)	0.050 (27)

## 4 РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЄКТУ

### 4.1 Резюме стартап-проєкту

Бізнес ідея: технологія іммобілізації пробіотичних штамів із сорбентом на основі високодисперсного кремнезему.

Мета наукової розробки: створення нового ефективного засобу для профілактики та лікування хвороб шлунково-кишкового тракту, викликаних дисбіозами.

Назва розробки: «Просорбент»

Суб'єкт замовлення: НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського».

Об'єкт дослідження: високодисперсний кремнезем та пробіотичні штами

Місце розробки в інноваційному ланцюжку цінності: проєкт знаходиться на етапі розробки: визначені основні біокомпоненти та технологія введення, пропорції компонентів необхідно коригувати.

Продукт наукової розробки: сорбований пробіотичний препарат для лікування дисбіозів, гострих кишкових інфекцій, покращення травлення, введення корисної мікрофлори до кишківника

Технологія: іммобілізація пробіотичних клітин на високодисперсному кремнеземі

Доступність сировинної бази: сировина доступна та постачається ДП «Іпровіт»

Кваліфікація персоналу: У технологічному процесі задіяні висококваліфіковані спеціалісти (хіміки, біотехнологи)

Ринок збуту: оптові постачальники фармацевтичних препаратів, роздрібна торгівля фармацевтичними препаратами.

Модель бізнесу: B2C, B2B2C.

Розширені характеристики подано в таблиці 4.1.



Таблиця 4.1 – Основні характеристики стартап-проекту

<b>Сутність ідеї</b>	Технологія іммобілізації пробіотичних штамів із сорбентом на основі високодисперсного кремнезему
<b>Продукт</b>	Препарат для лікування дисбіозів, гострих кишкових інфекцій, покращення травлення, введення корисної мікрофлори до кишківника
<b>Наявність аналогів або прототипів</b>	Аналоги: препарати російського виробництва «Пробіфор», «Флорин форте» (за дією)
<b>Основна потреба, яку задовільнить реалізований стартап</b>	Потреба у якісному пробіотичному препараті, що забезпечує доставку більшої кількості клітин до кишківника, ніж аналогічні
<b>Суб'єкт замовлення</b>	НТУУ «КПІ ім. І. Сікорського».
<b>Об'єкт дослідження</b>	Технологія виготовлення пробіотичного сорбованого препарату
<b>Мета наукової розробки</b>	Задоволення потреби у препараті, що допоможе вирішити проблему доставки пробіотичних бактерій до ШКТ з мінімальними втратами клітин та забезпечить більш якісне лікування захворювань, пов'язаних із дисбактеріозами, а також отримання прибутку
<b>Ступінь розробленості технології реалізації</b>	Апаратне забезпечення в межах лабораторії, визначені основні біокомпоненти та технологія введення, пропорції компонентів необхідно коригувати
<b>Наявність готового технологічного обладнання</b>	Наявна більшість обладнання на рівні лабораторії та заводу, для ефективнішого виробництва необхідно докупити типове обладнання
<b>Готовність базипостачальників для реалізації замовлень стартапу</b>	Компанія TELSTAR, Іспанія (сушарка сублимаційна), ТзОВ «АТКОМ» (ваги аналітичні) постачальники обладнання, підприємство «Іпровіт» постачальник компонентів
<b>КВЕД</b>	72.11 (дослідження й експериментальні розробки у сфері біотехнологій), 21.20 (Виробництво фармацевтичних препаратів і матеріалів)
<b>Очікувана потужність стартапу</b>	Мале підприємство (на старті)
<b>За масштабом виробництва</b>	Серійне
<b>За рівнем спеціалізації</b>	Вузькопрофільне
<b>За ресурсами, що споживатимуться</b>	Капіталомістке, матеріаломістке
<b>За чисельністю персоналу</b>	Мале
<b>За рівнем технологічної цілісності</b>	Дочірнє утворення
<b>За організацією виробничих процесів</b>	Періодичне
<b>Органи управління</b>	Національні
<b>Географічне розташування</b> а) потужностей б) офісу в) збутової мережі	а) м. Київ, вул. Євгена Сверстюка 4а б) м. Київ, вул. Політехнічна, 41 в) у мережі Інтернет, через каталоги, аптеки

Продовження табл. 4.1

<b>г)постачальників комплектуючих</b>	Україна (м. Львів), Іспанія
<b>Місце ідеї у ланцюжку цінностей</b>	розробка
<b>Бізнес-модель стартапу</b>	B2C (продаж без посередників)B2B2C (продаж через посередників – мережі аптек)
<b>Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)</b>	Аналогів немає, прототип «Лактовіт форте» (Реалізується споживачу, володіє нетоксичністю та зручною формою випуску).
<b>Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)</b>	Препарати «Пробіфор» та «Флорин форте». Знаходяться на етапі реалізації споживачу, однак використовуються здебільшого у тваринництві. Відсутні на українському ринку. Ціна упаковки «Пробіфору» із 10 капсул 727 рублів (266 грн), «Флорину форте» 267 рублів (98 грн). Володіють зручною формою.
<b>Ключові фактори успіху стартапу</b>	Ефективність, склад, безпечність.
<b>Споживачі на етапі розвитку</b>	Фізичні особи, вітчизняні фармацевтичні компанії
<b>Споживачі на етапі зрілості</b>	Міжнародні оптові постачальники пробіотичних препаратів, роздрібна торгівля препаратами
<b>Конкурентна ціна на продукт стартапу</b>	150 грн/од
<b>Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту</b>	52%
<b>Капіталовкладення упроект</b>	1275021 грн
<b>Період повернення капіталовкладень у проєкт</b>	2 роки
<b>Джерела фінансування</b>	Національні, власні чи запозичені кошти
<b>Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)</b>	Гідрогель метилкремнієвої кислоти – 70 % Пробіотичні штами висушені– 10 % Допоміжні речовини: лактози моногідрат– 20%. Продукція повністю готова.
<b>Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)</b>	На старті продаж відбуватиметься через сайт ТМ «Іпровіт», можливий продаж через мережі аптек після розширення виробництва

## 4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовищ стартапу та ключові фактори його успіху

Зовнішнє середовище безпосередньо не впливає на підприємство, але формує загрози і можливості цього підприємства. До факторів зовнішнього середовища відносять політику, економіку, географію, демографію, культуру, науково-технічний прогрес. Внутрішнє середовище підприємства – це його організація, техніко-технологічні особливості діяльності, кадри (їх кількісний та якісний склад, спеціалізація, рівень освіти, досвід), забезпеченість основними та оборотними засобами, стан основних засобів (рівень зношеності). Результати даного аналізу оформлено в таблицю 4.2.

Таблиця 4.2 – Загрози і можливості зовнішнього середовища

Загрози	Можливості
<b>Фактор - Політика</b>	
Погіршення політичної ситуації та, відповідно, відносин із державами, в які потенційно експортуватиметься препарат	Приваблення закордонних інвесторів Виведення препарату на міжнародний ринок
Зміни у податковій системі і законодавстві в цілому, що можуть вплинути.	Вітчизняна продукція користується значним попитом через доступність за ціновою політикою, обсяг збуту збільшився до 24 000 упаковок/рік після першого року товару на ринку.
<b>Фактор - Економіка</b>	
Постійне дорожчання обладнання, деталей обладнання, ремонту, допоміжних матеріалів. Зменшення попиту на пробіотичні препарати	Відносно невисока вартість (150 грн за одиницю проти 98 та 266 грн за закордонні аналоги) за рахунок використання вітчизняної сировини та більшої частини обладнання
Криза економіки через епідеміологічну ситуацію	Швидкий розвиток економіки країни, розвинення фондів та інших ринків, надходження іноземних інвестицій та кредитів у розмірі 200 тис грн/рік
Поява нових конкурентів, швидкі темпи інфляції	
<b>Фактор - Географія</b>	
Сировина доступна що може стати причиною появи конкурентів	Сировинну базу можна знайти у будь-якому регіоні країни. Можливість збуту продукції

Продовження табл. 4.2

<b>Фактор – Демографія</b>	
Збільшення числа трудових мігрантів Внаслідок зменшення місць за держамовленнях у ЗВО, можливе значне скорочення спеціалістів у галузі біотехнології та фармацевтики	Підвищення числа споживачів
<b>Фактор – Науково-технічний прогрес</b>	
Зростання залежності від інновацій	Можливість механізації і автоматизації більшості технологічних процесів. Можливе знаходження нових потенційних сполук, що можуть бути матрицями для пробіотичних препаратів та підвищувати виживаність клітин

Зовнішнє оперативне середовище містить наступні фактори: постачальників, посередників, споживачів. Його переваги та недоліки наведено в таблиці 4.3.

Таблиця 4.3 – Переваги і недоліки зовнішнього оперативного середовища

<b>Переваги</b>	<b>Недоліки</b>
<b>Фактори – Постачальник, Виробник</b>	
Впевненість у якості сировини.	Обов'язкова сертифікація сировини.
Обладнання для технології невеликих розмірів, що не потребує змін конструкції. Більшість обладнання українського виробництва, закордонне обладнання необхідно закупити одноразово.	Виробництво вимагає вкладень у вигляді обладнання Витрати електроенергії до 6% у с/в Витрати на тару та пакувальні матеріали до 4% у с/в Забезпечення персоналу засобами безпеки на 5000 грн.
Вітчизняний постачальник сировини, більшість сировини можна отримати на підприємстві «Іпровіт» (на базі якого знаходяться потужності виробництва стартапу). Обладнання стандартне, легко піддається заміні, випускається вітчизняною промисловістю. Широка сировинна база. Можливість випуску іншої продукції за тією ж технологією (ентеросорбентів без пробіотичної дії). Мала чисельність персоналу (до 5 осіб в межах заводу + до 10 осіб на виробництві). Відсутність змінності.	Присутність ручної праці. Можливі перебої із транспортуванням обладнання, отримання обладнання неналежного чи пошкодженого стану, труднощі з ремонтом та поверненням

Продовження табл. 4.3

<b>Фактор - Споживач</b>	
Дієвий засіб для лікування дисбіозу	Необізнаність споживачів щодо користі засобу. Незацікавленість через необізнаність.
<b>Фактор - Посередники</b>	
Можливість покладення на посередників пакувальних операцій, надання продукції товарного вигляду. Зменшення собівартості. Можливість продажу через мережу аптек. Перевезення на склад посередника – зменшення необхідної площі для власного складу.	Збільшення вартості готової продукції.
<b>Фактор - Конкуренти</b>	
Відсутність повних аналогів продукції на ринку. Аналогічні препарати майже не володіють необхідною ефективністю. Можливість удосконалення продукції. Поширення за допомогою мас-медіа, реклами, продакт-плейсменту. Можливість монополізації ринку України.	Наявність виробників інших пробіотичних препаратів, що є складовими даного препарату. Витрати на рекламу.

За результатами аналізу факторів зовнішнього і зовнішнього оперативного середовищ було сформовано перелік зацікавлених сторін (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Аналіз зацікавлених сторін

Зацікав. сторона	Вплив на реалізацію проекту	Цікавість до проекту	Заг. коеф. впливу на проект
Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища			
Конкурент	В разі недобросовісності, може впливати негативно шляхом негативної реклами	Зацікавлений у тому, щоб проект не був реалізований чи не окупився	0,1
Постачальник	Встановлює ціни на комплектуючі та сировину, тому впливає на собівартість готового продукту	Зацікавлений у тривалій співпраці на вигідних умовах, тобто у розвитку виробництва	0,2

Продовження табл. 4.4

Споживачі	Формують попит, що впливає на обсяги виробництва та продажу	Зацікавлені у покупці ефективного товару за прийнятною ціною (нижчою, ніж в аналогічних товарів)	0,2
Суб'єкти зовнішнього середовища			
Суб'єкти економічного середовища	Впливають на обсяги продажів через зміну економічних показників (інвестування коштів, курси валют, умови кредитування тощо)	Наявність вітчизняного пробіотичного препарату стане додатковим поповнення державного бюджету	0,2
Суб'єкти географії	Місцезнаходження та, відповідно, віддаленість постачальників сировини, а також збутової мережі впливатиме на собівартість готової продукції та транспортування	Зацікавленості немає	0,05
Суб'єкти демографії	Зниження кількості населення (низька народжуваність, еміграція тощо) зменшує кількість потенційних покупців та робітників	Зацікавлені у швидкому позбавленні від хвороб ШКТ, пов'язаних із дисбіозами <del>не продавши при цьому нірку</del> за низькою ціною	0,1
Суб'єкти культурного середовища	Новини про продукт стартапу можуть нести позитивний чи негативний відтінок, а, відповідно, чинити позитивний чи негативний вплив на обсяги реалізації	Зацікавлені в появі нових технологій та продуктів	0,1
Суб'єкти НТП	Підвищення якості освіти та розробка нових технологій сприятиме розвитку виробництва.	Зацікавлені у розвитку виробництва, як місця працевлаштування спеціалістів та впровадження нових наукових розробок.	0,1

Також було проведено аналіз внутрішнього середовища, що забезпечує визначення сильних та слабких сторін в процесі реалізації стартап-проекту (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Переваги і недоліки внутрішнього середовища

Складові внутрішнього середовища	Переваги	Недоліки
Реклама	Розміщення інформації на сайті, з якого буде вестися продаж; Просування через спеціалізовані каталоги та соцмережі	Затрати можуть бути досить високими, адже конкурувати із великими фармацевтичними компаніями, що виробляють пробіотичні препарати, досить проблематично
Фінанси	Достатня кількість власних фінансів, отримання гранту	Обмежений потік зовнішніх інвестицій.
Виробництво	Сучасне обладнання забезпечуватиме високу якість та потужність виробництва	Необхідність облаштування виробництва «з нуля»
Персонал	Високий рівень підготовки спеціалістів у сфері фармацевтичного виробництва	Недостатній досвід персоналу у виготовленні іммобілізованих пробіотичних препаратів
Організація управління	Залучення до роботи підприємства спеціалістів з бізнес планування та маркетингів.	Невелика чисельність адміністративного персоналу на етапі розвитку.

### 4.3. Визначення ключових факторів успіху проєкту

Для більш наглядної оцінки технічного рівня продукту проєктуванні і аналогів, а також для більшої об'єктивності оцінки порівнюємо дані готового товару методом Шонфільда (табл. 4.6).

Надалі кожен оцінку було переведено у бал, що відповідає її вагомості, результати подано у табл. 4.7.

Таблиця 4.6 – Визначення ключових факторів успіху проєкту методом Шонфільда

№	Характеристики	Вагомість характеристик	Пробіфор, Росія	Флорин форте, Росія	Препарат—предмет стартапу
1	Ефективність дії, % покращення х-ки	0,3	2	3	5
	Склад	0,3	2	3	5
2	Ціна, грн	0,2	2	4	4
3	Зручність форми	0,2	3,5	4	3

Таблиця 4.7 – Бальна оцінка характеристик за методом Шонфільда

Характеристика	Бальна оцінка характеристик		
	Пробіфор, Росія	Флорин форте, Росія	Препарат—предмет стартапу («Просорбент»)
Ефективність дії, % покращення х-ки	$0,3 \cdot 2 = 0,6$	$0,3 \cdot 3 = 0,9$	$0,3 \cdot 5 = 1,5$
Склад (к-сть пробіотиків, допоміжні речовини тощо)	$0,3 \cdot 2 = 0,6$	$0,3 \cdot 3 = 0,9$	$0,3 \cdot 5 = 1,5$
Ціна, грн	$0,2 \cdot 2 = 0,4$	$0,2 \cdot 4 = 0,8$	$0,2 \cdot 4 = 0,8$
Зручність форми	$0,2 \cdot 3,5 = 0,7$	$0,2 \cdot 4 = 0,8$	$0,2 \cdot 3 = 0,6$



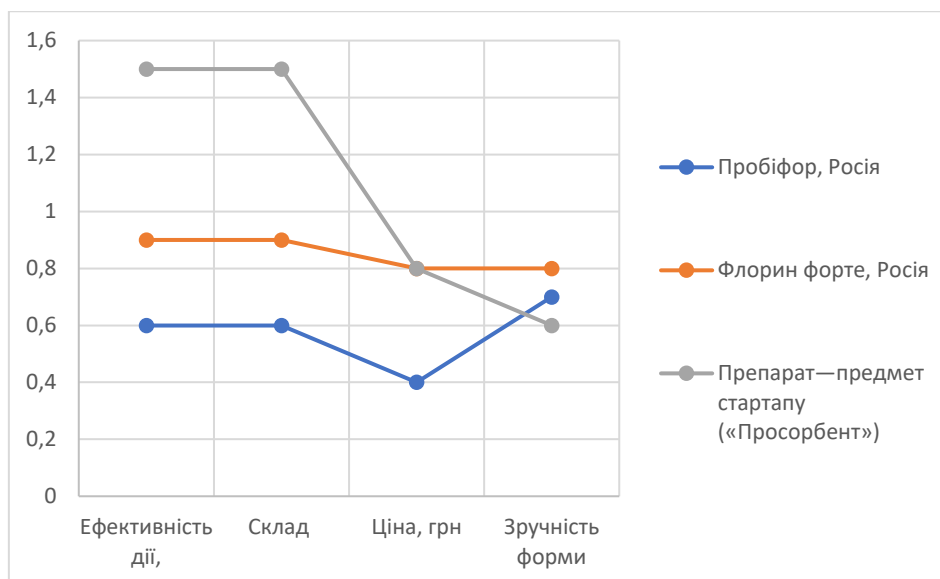


Рисунок 4.1– Аналіз ключових факторів успіху проєкту

У результаті виконання аналізу факторів успіху, такими визнано ефективність дії засобу та його склад. Аналоги препарату за дією значно поступаються йому за ефектом, прототипів на ринку України не представлено.

За ціною препарат є кращим лише за один препарат-конкурент, та ціна не є ключовим фактором успіху і цей показник не є загрозою. Зручність форми виявилася слабким місцем препарату, однак вона володіє нижчими показниками відносно закордонних конкурентів, українські ж препарати-аналоги володіють такою ж формою. Аналіз усіх факторів показує, що продукт є цінним та вартим того, щоб вводити його на ринок.

На основі аналізу ключових факторів успіху стартап-проєкту визначалися можливі варіанти розвитку інноваційної ідеї (табл. 4.8).

Таблиця 4.8 – Варіанти розвитку ідеї стартапу

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
Продаж технології на етапі розробки іншим компаніям-виробникам пробіотичних препаратів/заквасо	Продаж технології як більш ефективної
Встановлення ціни на продукцію нижчої за ціну конкурента	Приваблення споживачів на початкових етапах завдяки продажу більш ефективного та безпечного продукту за звичною ціною

Продовження табл. 4.8

Варіант	Стислий опис можливого розвитку
Популяризація новітніх технологій у харчовій промисловості	Створення посібників, журналів, блогів, що висвітлюють різні аспекти використання нанокompозитів у виробництві пробіотиків

#### 4.4. Визначення потенційних споживачів

Огляд основних груп потенційних споживачів та їх потреб наведено у табл. 4.9. Оскільки компанія проводитиме як оптову, так і роздрібну торгівлю, в якості споживачів розглядалися юридичні та фізичні особи (табл. 4.10).

Таблиця 4.9 – Основні групи потенційних споживачів і їх потреби

Категорія (група) клієнтів	Потреби, які він задовольняє за допомогою Вашого продукту
Юридична особа (компанія із виробництва пробіотичних препаратів)	Потреби мати серед асортименту ефективний пробіотичний засіб вітчизняного виробництва
Фізична особа	Потреба у лікуванні дисбіозу чи його профілактиці

Таблиця 4.10 – Класифікація потенційних споживачів

Критерій	Значення
Юридична особа	
1. Форма власності	Державні та приватні
2. КВЕД	21.20 Виробництво фармацевтичних препаратів і матеріалів 46.46 Оптова торгівля фармацевтичними товарами
3. За потужністю	малі, середні, великі
4. За масштабом виробництва	одиничні, серійні, масові
5. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільні, багатoproфільні
6. За ресурсами, що споживаються	Працемісткі, матеріаломісткі
7. За чисельністю персоналу	Малі, середні, великі
8. За сферою діяльності	Оптова та роздрібна торгівля

Продовження табл. 4.10

9. За приналежністю капіталу і контролю	Національні, іноземні
9. За приналежністю капіталу і контролю	національні, іноземні, спільні багатонаціональні
10. За географічним розташуванням	Україна, інші країни
11. За віддаленістю органів управління	Національні, іноземні, транснаціональні
12. За характером господарської діяльності	фармацевтичні
13. За рівнем технологічної цілісності	Провідні, дочірні, філії
14. За долею іноземного капіталу	Без іноземних інвестицій, з іноземними інвестиціями, іноземні
15. За формуванням статутного капіталу	Унітарні, корпоративні
16. За організацією виробничих процесів	періодичні, безперервні
17. За роботою протягом року	Сезонні, позасезонні
18. За географічним розташуванням на території України	Великі міста, обласні та регіональні центри
19. За динамікою розвитку регіону розташування юридичної особи: – Регіон – Чисельність населення – Динаміка росту регіону	У столиці, обласних та регіональних центрах, населення від 10 тис осіб Приріст населення 1,5-3% щорічно згідно загального українського законодавства
<b>Фізична особа</b>	
1. Вік	18 – 90 років
2. За платоспроможністю	Платоспроможні, середній дохід
3. За соціальним рівнем споживачів	Володіють нерухомістю, мають середній чи вищий середнього рівень заробітної плати
4. За способом життя (звички, традиції, стереотипи поведінки)	Як одинокі, так і заміжні/одружені люди. Особи, що уважно ставляться до стану свого здоров'я, а також ті, хто вже мають хвороби ШКТ, викликані дисбактеріозами
5. Тип особистості споживачів	Реалісти, новатори, традиціоналісти
6. За ставленням до товару	Мотивація покупки товару – коригування хвороб, спричинених дисбіозом чи їх профілактика
7. За сімейними цінностями	Як самотні так і одружені люди, будь-який склад сім'ї
8. За співвідношенням бажання придбати і цінової межі	5000 грн – 150 грн 10000 грн – 150 грн
9. За інтенсивністю споживання товару	Періодичне чи систематичне придбання
10. За інформованістю	Самоосвіта, ЗМІ, спеціалізовані джерела

Основними клієнтами на старті виробництва виступають саме фізичні особи, в подальшому ж можливий продаж технології для фармацевтичних компаній або ж продаж готової продукції компаніям, що займаються оптовою торгівлею фармпрепаратами.

Проведено планування обсягу реалізації продукції у початковому періоді – на перший рік виробництва (табл. 4.11). При цьому було враховано пік інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту, що потребують вживання пробіотичних препаратів (літній період).

Таблиця 4.11 – Обсяг реалізації, запланований для стартап-продукту на перший рік виробництва

Період	Запланований обсяг, од.
Січень 2021	600
Лютий 2021	600
Березень 2021	600
Квітень 2021	800
Травень 2021	1000
Червень 2021	1500
Липень 2021	1500
Серпень 2021	1500
Вересень 2021	1300
Жовтень 2021	1000
Листопад 2021	800
Грудень 2021	800
Всього:	12000

#### 4.5 Оцінка ринкових позицій інноваційної розробки

##### Джерела фінансування

Основними джерелами фінансування є власні кошти, а також за необхідності участь у конкурсах із отримання гранту чи отримання кредитних коштів. Залучення відбувається не лише завдяки хорошим техніко-економічним показникам, а і через прикладний характер наукових досліджень, що є гнучким, оригінальним і має потенційні можливості для розширення.

### Розрахунок ціни інноваційної пропозиції

Проведено розрахунки ціни інноваційної пропозиції на ринку за різними методами. Для розрахунку розміру амортизаційних відрахувань необхідно розрахувати розмір основних фондів стартапу, що наведені у таблиці 4.12.

Таблиця 4.12 – Вартість основних фондів стартапу

Одиниця	Кількість, шт	Вартість одиниці обладнання, грн	Вартість за кількість обладнання, грн
Сушарка ліофільна	1	40000	40000
Лабораторні ваги	1	10000	10000
Змішувач лабораторний	1	15000	15000
Термостат	1	20000	20000
Ферментер	1	30000	30000
Колби конічні	5	150	750
Пробірки	5	50	250
Чашки Петрі	10	50	500
Піпетки	25	20	500
<b>Загальна вартість</b>			<b>117000 грн</b>

Амортизація приладів, інвентарю – термін експлуатації 5 років:

$$A = OЗ / T_{\text{експл}} = 52\,300 / 5 = 23400 \text{ грн/рік.}$$

В таблиці 4.13 наведені заробітні плати працівників для розрахунку фонду оплати праці.

Отже собівартість проекту складає:

$$C = A + OбЗ = 23400 + 1158021 = 1181421 \text{ грн/рік.}$$

Товар буде випускатися в упаковках, кожна з яких містить по 5 пакетиків препарату, плановий випуск 2600 упаковок на рік.

Таблиця 4.13 – Заробітні плати працівників

Посада	Кількість працівників	Заробітна плата на одного працівника грн/міс	ЗП, грн/рік
Директор-розробник	1	15000	180000
Науковий консультант	1	15 000 (3 місяці)	45000
Технолог	1	10000	120000
Лаборант	3	7000	252000
Пакувальник-продажник	1	7000	84000
Всього			681000

Таблиця 4.14 – Вартість оборотних засобів

Оборотні засоби	Ціна, грн/од	Кількість, шт	Загальна вартість, грн/рік
Реактиви	30	12000	360000
Тара	3	12000	36000
Пакування	5	12000	60000
Електроенергія	1,68 грн/кВт*год	500 кВт*год/міс	10080
Водопостачання	21,756 за 1м <sup>3</sup>	20 м <sup>3</sup> /міс	5221
Реклама в Інтернеті та каталогах			5000
ФОП			681000
Оборотні засоби			1158021

## 1. Витратний метод.

$$Ц = С + \%П = \frac{1181421}{12000} + 3\% = 101,4 \text{ грн.}$$

Де Ц – ціна одиниці товару, грн., С – собівартість одиниці, грн., %П – відсоток прибутку, %П = 1-3%.

## 2. Агрегатний метод.

$$Ц = Ц_1 + Ц_2 + \dots + Ц_n = 106,25 \text{ грн} + 14,65 \text{ грн} + 3 \text{ грн} + 5 \text{ грн} = 128,9 \text{ грн.}$$

Де Ц - ціна одиниці товару, грн., Ц<sub>1...n</sub> – ціни складових частин, грн.

## 3. Параметричний метод.

$$Ц_n = \frac{Б_n}{Б_6} \cdot Ц_6 = \frac{9}{6} \cdot 88,18 = 132,27 \text{ грн.}$$

Де Ц<sub>n</sub> – ціна нового продукту, грн., Ц<sub>6</sub> – ціна базового продукту (був взятий пробіотичний препарат Флорин), грн., Б<sub>6</sub> – бали за властивості базового продукту,

$B_n$  – бали за властивості нового продукту (вирішальними і принципово новими були: ефективність дії на мікрофлору шлунка та доступність на українському ринку).

4. Метод точки беззбитковості.

$$Ц = C = \frac{1181421}{12000} = 98,45 \text{ грн.}$$

Де  $Ц$  – ціна одиниці товару, грн.,  $C$  – собівартість одиниці, грн.

5. Метод конкурентних цін.

$$Ц = \frac{Ц_{x1} + Ц_{x2} + Ц_{x3}}{N} = \frac{88,18 + 220,46}{2} = 154,32 \text{ грн.}$$

Де  $Ц$  – ціна одиниці товару, грн.,  $Ц_{x1,x2}$  – ціни конкурентів, грн.,  $N$  – кількість використаних цін конкурентів.

Для ціноутворення були проаналізовані різні методи, а також вибрана ціна продукту у 150 грн, що є дещо вищою, ніж в одного з конкурентів, але є виправданою за методом конкурентних цін, враховуючи, що товари-конкуренти на українському ринку не представлені і в разі імпорту їх ціна була би вищою.

### **Техніко-економічні показники стартап-проєкту**

1. Річний обсяг реалізації ідеї:

$$B = 12000 \text{ упаковок.}$$

2. Капіталовкладення у проєкт:

$$K = OF + O\delta Z = 117000 + 1158021 = 1275021 \text{ грн;}$$

на одиницю продукції:

$$K = 1275021 / 12000 = 106,25 \text{ грн/шт.}$$

3. Повна собівартість:

$$C = A + O\delta Z = 23400 + 1158021 = 1181421 \text{ грн;}$$

на одиницю продукції:

$$C = 1181421 / 12000 = 98,45 \text{ грн/упаковку.}$$

4. Відносний прибуток:

$$\Pi = Ц - C = 150 - 98,45 = 51,55 \text{ грн/од.}$$

## 5. Рентабельність:

$$P = (П/С) \times 100\% = (51,55/98,45) \times 100\% = 52\%.$$

## 6. Період повернення капіталовкладень:

$$T_{\text{пов}} = К/П = 106,25/51,55 \sim 2 \text{ роки}$$

## 7. Фондовіддача виробничих фондів:

$$ФВ = (Ц \times V)/ОФ = (150 \times 12000)/117000 = 15,38 \text{ грн/грн.}$$

## 8. Фондоємність:

$$ФЄ = 1/ФВ = 1/15,38 = 0,07 \text{ грн/грн.}$$

## 9. Коефіцієнт економічної ефективності:

$$E = П/К = 51,55/106,25 = 0,49.$$

Усі техніко-економічні показники зібрано до таблиці 4.15.

Таблиця 4.15 – Техніко-економічні показники проєкту

Показники	Одиниця виміру	Значення
1. Річний обсяг реалізації ідеї, технології, методики	одиниці	12000
2. Середньорічна чисельність персоналу за списком	осіб	7
3. у тому числі основних інженерно-технічного персоналу	осіб	3 4
4. Середньорічний виробіток робітника	од/особу	1714
5. Капіталовкладення у проєкт: - всього	грн.	1275021
- на одиницю продукції	грн/од	106,25
6. Повна собівартість - всього	грн.	1181421
- на одиницю продукції	грн/од	98,25
7. Відносний прибуток - всього	грн.	618 600
- на одиницю продукції	грн/од	51,55
8. Рентабельність	%	52



Продовження табл. 4.15

Показники	Одиниця виміру	Значення
9. Період повернення капіталовкладень	років	2
10. Фондовіддача виробничих фондів	грн/грн	15,38
11. Фондоємкість	грн/грн	0,07
12. Продуктивність праці	грн/особу	857
13. Коефіцієнт економічної ефективності		0,49

### Концепція бізнес-моделі проєкту та карта бізнес-процесів

Розробниками була обрана концепція B2C або Businessstocustomer («бізнес для споживача»), що найбільше відповідає діяльності стартапу. Вона направлена на співпрацю зі споживачами напряму. У майбутньому можливий перехід до моделі B2B2C, що передбачає співпрацю з іншими компаніями. Також було побудовано карту бізнес-процесів стартапу, де визначено основні характеристики процесів поетапно (табл. 4.16).

Таблиця 4.16 – Карта бізнес-процесів

Стадія реалізації стартаппроєкту	Бізнес-процеси	Характеристики		
		Задіяні ресурси	Приблизна тривалість процесу	Верхня межа фінансових витрат
Розробка ідеї стартапу	Генерація ідеї	особи	10 год	80 грн
	Пошук наукових статей	2 особи	10 год	80 грн
	Зустріч зі спеціалістом	3 особи	2 год	16 грн
	Створення команди	3 особи	4 год	32 грн
	Домовленості	4 особи	6 год	48 грн
	Пошук і доставка м'ясного сула	3 особи	36 годин	300 грн
Реалізація ідеї	Проведення досліджень	Обладнання, лабораторія, 2 особи	50 год	400 грн
	Визначення форми і концентрації	Обладнання, лабораторія, 2 особи, комп'ютер	20 год	160 грн

Продовження табл. 4.16

Впровадження у виробництво	Масштабування в умовах заводу	2 особи, лабораторія на заводі	20 год	160 грн
	Вибір тари	1 особа	2 год	16 грн
	Уточнення норм витрат, рецептури та технології	3 особи, оснащена лабораторія	40 год	320 грн
	Формування інструкцій	1 особа	3 год	24 грн
	Перепідготовка кадрів	1 особа	5 год	40 грн
	Контроль якості	2 особи. лабораторія	12 год/рік	96 грн
Масова реалізація	Реклама у каталогах та на інтернет-сайтах	1 особа	-	500 грн
	Встановлення контактів зі споживачами та посередниками	2 особи	10 год	80 грн
	Формування договорів	2-4 особи	10 год	80 грн
	Розробка куточка споживача	1 особа	3 год	24 грн
Продаж проєкту	Договори із покупцями	2 особи	10 год	-
	Проведення тендеру	2 особи	8 год	-
	Вибір місця проведення торгів	1 особа	2 год	-
	Формування договору продажу та остаточний продаж стартапу	2-4 особи	5 год	-

На основі карти бізнес-процесів виконання стартап-проєкту, було проведено розподіл функцій між відповідальними за їх реалізацію працівниками та визначено кадрові потреби стартап-проєкту на кожному із етапів (табл. 4.17).

Таблиця 4.17 – Системний аналіз бізнес-процесів стартапу

Функції	Розробник	Науковий консультант	Технолог	Лаборант	Пакувальник-продажник
Генерування ідеї	+	+			
Формування команди та домовленостей	+	+	+	+	
Огляд літератури	+	+			
Пошук і доставка сировини	+		+		
Проведення досліджень	+			+	
Визначення концентрації та форми препарату	+				
Масштабування в умовах заводу	+		+		
Вибір тари і пакування	+				+
Уточнення норм витрат, рецептури та технології	+		+		
Формування інструкцій			+	+	
Перепідготовка кадрів			+		
Контроль якості	+		+		

Продовження табл. 4.17

Реклама у каталогах та на інтернет-сайтах	+				+
Встановлення контактів зі споживачами та посередниками	+				+
Формування договорів	+				+
Розробка куточка споживача	+				+
Договори із покупцями	+				+
Проведення тендеру	+				+
Вибір місця проведення торгів	+				+
Продаж проєкту	+				+

#### 4.6 Оцінка ризиків та страхування розробки

Сформовано перелік ризиків, що можуть загрожувати підприємству. Для кожного з ризиків оцінювалася імовірність настання та вплив на очікуваний результат. Результати системного аналізу ризиків бізнес-процесу наведено у табл. 4.18.

Таблиця 4.18 – Оцінка ризиків

Бізнес-процес	Ризик	Ймовірність настання ризику	Вплив ризику на дохід
Генерування ідеї	Втома автора	Низька	Середній
Формування команди	Некомпетентність членів команди	Низька	Високий

Продовження табл. 4.18

Огляд літератури	Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою	Низька	Низький
Пошук і доставка сировини	Використання непідходящої сировини	Низька	Високий

Результати оцінювання всіх ризиків за критеріями настання та впливом на очікуваний результат наведено у матриці оцінки ризиків (табл. 4.19).

Таблиця 4.19 – Матриця оцінки ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат	За ймовірністю настання ризиків			
	Критерій ризику	Низька ймовірність	Середня ймовірність	Висока ймовірність
	Числове значення	1	2	3
Високий рівень впливу	3	- Використання непідходящої сировини, - некомпетентність членів команди, - похибки досліджень: людський фактор, несправність обладнання	- Вибір непідходящих форми та/або концентрації - Неправильно вибране обладнання, невдала технологія	

Продовження табл. 4.19

Середній рівень впливу	2	- Втома автора, - невдале пакування, - недотримана технологічна наповненість інструкції, - некомпетентність кадрів та/або спеціаліста з перепідготовки,	- Недієва реклама, - невдало вибрані методи контролю - занадто низька/висока ціна проєкту	
Низький рівень впливу	1	- Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою		

Для усіх визначених ризиків розроблено план з управління ними (табл. 4.20).

Таблиця 4.20 – План заходів з управління ризиками

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповіда льні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Некомпетентність членів команди	Попередження ризику	Директор	Стадія створення команди	Ретельний підбір кваліфікованих людей
Невміння швидко знаходити необхідну літературу за темою	Попередження ризику	Директор	Стадія генерування ідеї	Виділити більшу кількість часу
Використання неподходящої сировини	Передача ризику	Директор, лаборант	Стадія досліджень	Детальне обговорення із технологом
Похибки досліджень: людський фактор, несправність обладнання	Попередження ризику	Лаборант, технолог	Стадія впровадження у виробництво	Ретельне проведення досліджень із перевіркою на різному обладнанні

Продовження табл. 4.20

Вибір непідходящих форми та/або концентрації	Попереджен ня та передача ризик	Науковий консульт., директор	Стадія досліджень	Довший час для підбору оптимальних параметрів, консультації зі спеціалістом
Неправильно вибране обладнання, невдала технологія	Передача ризик	Технолог, науковий консультант	Стадія досліджень, впровадження у виробництво	Консультації з технологом
Невдале пакування	Попереджен ня ризик	Пакувальник- продажник	Стадія реалізації	Перевірка на цільовій аудиторії
Невдале уточнення параметрів	Попереджен ня ризик	Директор, науковий консультант	Стадія впровадження у виробництво	Уважна перевірка усіх розрахунків
Недотримана технологічна наповненість інструкції	Попереджен ня та передача ризик	Технолог	Стадія впровадження у виробництво	Виготовлення інструкцій відповідно до стандартів та із залученням спеціалістів
Назва ризик	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Некомпетентність кадрів та/або спеціаліста з перепідготовки	Передача ризик	Технолог	Стадія впровадження у виробництво	Проведення перепідготовки особисто
Невдало вибрані методи контролю	Передача ризик	Технолог	Стадія впровадження у виробництво	Обговорення вибору методів контролю із науковим консультантом
Недієва реклама	Передача ризик	Пакувальник- продажник	Стадія реалізації	Особистий продаж, детальний аналіз рекламних сайтів
Занадто низька/висока ціна проєкту. Проект не окупиться.	Передача ризик	Пакувальник- продажник, директор	Стадія продажу проєкту	Перевірка розрахунків із досвідченим економістом
Втома автора	Попереджен ня ризик	Директор	Стадія генерування ідеї	Подовження тривалості реалізації стартапу

## ВИСНОВКИ

Встановлено можливість створення іммобілізованих препаратів пробіотичних культур на високодисперсному кремнеземі без втрати функціональних властивостей заквашувального препарату на їх основі.

1. Визначено, що іммобілізація пробіотичних культур на гідрогелі метилкремнієвої кислоти спричиняє меншу загибель клітин, ніж на порошкоподібному сорбенті, адже виживаність клітин після ліофільної сушки за використання гідрогелю була вища ( $\lg 7,6$  КУО/г до сушки проти  $\lg 6,8$  КУО/г після сушки для *B. longum* та  $\lg 7,6$  КУО/г проти  $\lg 6,2$  КУО/г для *S.thermophilus* до та після сушки, відповідно).

За моделювання умов шлунка іммобілізовані у гідрогелі метилкремнієвої кислоти культури *S.thermophilus* та *B. longum* показали кращу виживаність клітин, ніж контрольні зразки ( $\lg 7,6$  КУО/г та  $\lg 7,1$  КУО/г для іммобілізованих культур проти  $\lg 4,8$  КУО/г та  $\lg 5,8$  КУО/г у контрольних зразках).

2. Показано, що культура *S. thermophilus* після іммобілізації на гідрогелі метилкремнієвої кислоти залишалась достатньо функціональною для отримання кисломолочного йогурту на основі такого заквашувального препарату. Визначені основні реологічні характеристики кисломолочного продукту показали, що згусток, утворений іммобілізованою культурою *S.thermophilus*, мав вищу (на 15%) ефективну в'язкість і стійкість до механічного впливу та кращу тиксотропність. Тривалість сквашування молока збільшувалась на 2-2,5 год через зменшення початкової кількості життєздатних клітин. Не іммобілізований та іммобілізований штам *S. thermophilus* характеризувався помірним рівнем енергії кислотоутворення, гранична кислотність сквашеного молока становила  $100^{\circ}\text{T}$  та  $95^{\circ}\text{T}$ , відповідно. Продукти мали чистий кисломолочний смак, щільну, в'язку консистенцію, яка не псувалась в процесі зберігання.



3. Фрактальний аналіз мікрозображень продемонстрував вплив статичного магнітного поля на утворення структур паличковидними та коковидними формами іммобілізованих і неіммобілізованих пробіотичних культур на кремнієвих пластинках. Показники зразків, що перебували під впливом магнітного поля, відрізнялися від контрольних, зокрема відмічено дещо вищу фрактальну розмірність (до 8 %) та значно меншу лакуарність (до 66%) порівняно з контролем.
4. Розроблено стартап-проект із виробництва пробіотичногозаскваскового препарату, іммобілізованого на вдк. Собівартість склала 1181421 грн, коефіцієнт економічної ефективності – 0,49

## ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

- Anal, A.K. and Singh, H. "Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery." *Trends in Food Sci & Technol*, 2007: 240-251.
- Andersson, H., Asp, N. G., Bruce, A., Roos, S., Wadstrom, T., and Wold, A. E. "Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies." *Scandinavian Journal of Nutrition*, 2001: 58-75.
- Baeza, A., Colilla, M., Vallet-Regí, M. "Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery." *Expert Opin. Drug Deliv*, 2015: 319–337.
- Beck, J., Randall, L. *The NCBI Handbook 2nd edition*. National Center for Biotechnology Information. November 14, 2013.
- Boke, H., Aslim, B., Alp, G. " The role of resistance to bile salts and acid tolerance of exopolysaccharides produced by yogurt starter bacteria." *Arch. Biol. Sci*, 2010: 323-328.
- Chen, L., Zhang, J. "Bioconjugated Magnetic Nanoparticles for Rapid Capture of Gram-positive Bacteria." *J. Biosens. Bioelectron*, 2012.
- Dalal, N.S., Shi, X.L., Vallyathan, V. "Role of free radicals in the mechanisms of hemolysis and lipid peroxidation by silica: comparative ESR and cytotoxicity studies." *J. Toxicol. Environ. Health.*, 1990: 307–316.
- De Angelis, M., and M. Gobbetti. "Environmental stress responses in lactobacillus: A review." *Proteomics*, 2004: 106-122.

- Di Cerbo, A., Palmieri, B., Aponte, M., Morales-Medina, J. C., Iannitti, T. "Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli." *Journal of Clinical Pathology*, 2016: 187–203.
- Dianawati, D. "Survival of encapsulated probiotic bacteria during storage at low water activity at ambient temperature ." *Doctoral dissertation, Victoria University*. 2014.
- Ding, W., Shah, N. "Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria." *Journal of Food Science*, 2009: 100-107.
- Facklam, R. "What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes." *Clin Microbiol Rev*, 2002.
- FAO/WHO. "Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria." *Report of a joint FAO/WHO expert*. Cordoba, Argentina, October 1-4 , 2001.
- Fijan, S. "Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature." *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2014: 4745-4767.
- Fubini, B. "Health Effects of Silica." *The Surface Properties of Silicas*, 1998: 415–464.
- Fubini, B., Fenoglio, I., Elias, Z., Poirot, O. "Variability of biological responses to silicas: effect of origin, crystallinity, and state of surface on generation of reactive oxygen species and morphological transformation of mammalian cells." *J. Environ Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2001: 95-108.
- Gao, X. Y., Zhi, X. Y., Li, H. W., Klenk, H. P., Li, W. J. "Comparative Genomics of the Bacterial Genus *Streptococcus* Illuminates Evolutionary Implications of Species Groups." *PLOS ONE* , 2014.

- García-Albiach, R., Pozuelo de Felipe, M. J., José, M., de Felipe, P., Angulo, S., Morosini, M.-I., Del Campo, R. «Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota.» *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2008: 91-96.
- Gorobets, O Yu, Gorobets, S V, Sorokina, L V. "Biom mineralization and syntesis of biogenic magnetic nanoparticles and magnetosensitive inclusions in microorganisms and fungi." *Functional Materials*, no. 4 (2014): 15-21.
- Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., Cocconcelli, P. S. "Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*." *Microbiology-Sgm*, 2001: 2255-2264.
- Haffner, F., Girardon, M., Etienne, M. "Core-shell alginate @ silica microparticles encapsulating probiotics." *J. Mater. Chem. B.*, 2016.
- Harley, J.D., Margolis, J. "Hemolytic activity of colloidal silica." *Nature*, 1961: 1010–1011.
- Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. "Transglutaminase-induced caseinate gelation for the microencapsulation of probiotic cells." *International Dairy Journal*, 2009: 77-84.
- Hoffmann, F., Cornelius, M., Morell, J., Fröba, M. "Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials." *Angew. Chem.* , 2006: 3216–3251.
- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Kleerebezem, M. " New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics." *FEMS Microbiology Reviews*, 2005.

- Hurduc, V., Plesca, D., Dragomir, D., Sajin, M., Vandenplas, Y. " A randomized, open trial evaluating the effect of *Saccharomyces boulardii* on the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection in children." *Acta Paediatrica* , 2009: 127–131.
- Isolauri, E. Salminen, S. "Probiotics, gut inflammation and barrier function." *Gastroenterology Clinics of North America*, 2005: 437.
- Ito, M., Ohishi, K., Yoshida, Y., Okumura, T., Sato, T., Yokoi, W., Sawada, H. "Preventive effect of *Streptococcus thermophilus* YIT 2001 on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008: 2543–2547.
- Jelinek, H. F., Elston, N., & Zietsch, B. "Fractal analysis: pitfalls and revelations in neuroscience." *Fractals in biology and medicine* , 2005: pp. 85-94.
- Junjua, M., Kechaou, N., Chain, F., Awussi, A. A., Roussel, Y., Perrin, C., Dary-Mourot, A. "A large scale in vitro screening of *Streptococcus thermophilus* strains revealed strains with a high anti-inflammatory potential." *LWT - Food Science and Technology*, 2016: 78–87.
- Kailasapathy. "Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications." *Curr Issues Intest Microbiol*, 2002: 39-48.
- . "Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt." *LWT-Food Science and Technology*,, 2006: 221-1227.
- Karperien, A. "FracLac for ImageJ." 2013.
- Karperien, A., Jelinek, H., and Milosevic, N. "8th European Conference on Mathematical and Theoretical Biology ." *Reviewing lacunarity analysis and classification of microglia in neuroscience*,. Cracow: uropean Society for Mathematical and Theoretical Biology (ESMTB), 2011.

- Korpela, K., Salonen, A., Virta, L. J., Kumpu, M., Kekkonen, R. A., & de Vos, W. M. "Lactobacillus rhamnosus GG intake modifies preschool children's intestinal microbiota, alleviates penicillin-associated changes, and reduces antibiotic use." *PLoS ONE*, 2016.
- Li, Q.Q., Chen, Q.H., Hui, R., Zhu, D.S., and He, G.Q. :. "Isolation and characterization of an oxygen, acid and bile resistant *B. animalis* subsp *lactis* Qq08." *J Sci Food Agric*, 2010: 1340-1346.
- Ljungh, Å., Wadström, T. "Lactic acid bacteria as probiotics Microbiol." *Curr Issues Intestinal*, 2006: 73-90.
- Makino, S., Ikegami, S., Kume, A., Horiuchi, H., Sasaki, H., & Orii, N. "Reducing the risk of infection in the elderly by dietary intake of yoghurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1." *The British Journal of Nutrition*, 2010: 998–1006.
- Mandelbrot, B. B. *The fractal geometry of nature*. New York: NW Freeman and CO, 2004.
- Martra, G., Tomatis, M., Fenoglio, I., Coluccia, S., Fubini, B. " Ascorbic Acid modifies the surface of asbestos: possible implications in the molecular mechanisms of toxicity." *Chem. Res. Toxicol.*, no. 16 (2003): 328-335.
- Marynchenko, L., Nizhelska, O., Kurylyuk, A., Makara, V. , Naumenko, S. "Observed effects of electromagnetic fields action on yeast and bacteria cells attached to surfaces." *IEEE 40th International Conference on Electronics and Nanotechnology (ELNANO)*, 2020: 603-608.
- Mathelié-Guinlet, M., Béven, L., Moroté, F, Moynet, D., Grauby-Heywang, C., Gammoudi, I., Delville, M., Cohen-Bouhacina, T. "Probing the threshold of

- membrane damage and cytotoxicity effects induced by silica nanoparticles in Escherichia coli bacteria." *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2017: 81-91.
- Mathelié-Guinlet, M., et al. "Probing the threshold of membrane damage and cytotoxicity effects induced by silica nanoparticles in Escherichia coli bacteria." *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2014: 81–91.
- Nag, A. "Studies on the stability of probiotic bacteria during long term storage: a thesis presented in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Food Technology at Massey University." *Doctoral dissertation, Massey University*). Palmerston North, 2019.
- National Center for Biotechnology Information*. n.d.
- NIOSH. "Health effects of occupational exposure to respirable crystalline silica. Department of health and human services centers for disease control and prevention national institute for occupational safety and health." *DHHS (NIOSH) Publication*. 2002. 129.
- Nizhelska, O., Marynchenko, L., Makara, V., Naumenko, S., Kurylyuk A. "The Stabilizing Effect of Magnetic Field for the Shape of Yeast Cells *Saccharomyces cerevisiae* on Silicon Surface." *Innov Biosyst Bioeng*, 2018: 278-286.
- O’Callaghan, A., van Sinderen, D. "Bifidobacteria and their role as members of the human gut microbiota." *Frontiers in Microbiology*, 2016.
- Orłowski, A., Bielecka, M. "Preliminary characteristics of lactobacillus and bifidobacterium strains as probiotic candidates." *Pol J Food Nutr Sci*, 2006: 269-275.
- Paris, J.L., et al. "Ultrasound-mediated cavitation-enhanced extravasation of mesoporous silica nanoparticles for controlled-release drug delivery." *Chem. Eng. J.*, 2018: 2–8.

- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., Matuchansky, C. "Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effect." *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 2005: 495-512.
- Quigley, E. M. M. "Prebiotics and Probiotics in Digestive Health Gastroenterology and Hepatology." 2019: 333-344.
- Semyonov, D., Ramon, O., Kovacs, A., Friedlander, L., Shimoni, E. "Air-suspension fluidized-bed microencapsulation of probiotics." *Drying Technology*, 2012: 1918-1930.
- Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J., van Hylckama Vlieg, J. E. T. "Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches." *Applied and Environmental Microbiology*, 2008: 4997–5007.
- Stanton, C., Desmond, C., Coakley, M., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P. "Challenges facing development of probiotic-containing functional foods." *Handbook of Fermented Functional Foods*, 2003: 27-58.
- Stratta, P., Canavese, C., Messuerotti, A., Fenoglio, I., Fubini, B. " Silica and renal diseases: no longer a problem in the 21st century?" *J.Nephrol.*, 2001: 28-247.
- Sztojánov, I., Crișan, D. A., Mina, C.P. , Voinea V. "Image Processing in Biology Based on the Fractal Analysis." In *Image Processing* , edited by Yung-Sheng Chen. IntechOpen, 2009.
- Uriot, O., Denis, S., Junjua, M., Roussel, Y., Dary-Mourot, A., Blanquet-Diot, S. " Streptococcus thermophilus: From yogurt starter to a new promising probiotic candidate?" *Journal of Functional Foods*, 2017: 74-89.
- Vallet-Regí, M. "Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine." *J. Intern. Med.* , 2010: 22–43.



- Wang, Y., & Huang, Y. "Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* supplementation to standard triple therapy on *Helicobacter pylori* eradication and dynamic changes in intestinal flora." *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014: 847-853.
- Wang, Y., et al. "Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications." *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med*, 2015: 313–327.
- Wehling, J., Volkmann, E., Grieb, T., Rosenauer, A., Maas, M., Treccani, L., Rezwan, K. "A critical study: Assessment of the effect of silica particles from 15 to 500 nm on bacterial viability." *Environ. Pollut.*, 2013: 292–299.
- Yang, S., et al. "Bacteria-Targeting Nanoparticles with Microenvironment-Responsive Antibiotic Release to Eliminate Intracellular *Staphylococcus aureus* and Associated Infection." *CS Appl. Mater. Interfaces*, 2018: 14299–14311.
- Бабінець, О.М. *Біологічні властивості іммобілізованих на ентеросорбентах пробіотиків після низькотемпературного зберігання*. дисертація кандидата медичних наук, НАН України, Харків: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини, 2016.
- Бондарчук, О.И. «Механизмы антисептического действия полисорба .» *Материалы. 2 Укр. научн. конф. с международ. участием "Актуальные проблемы клинической фармакологии"*. Винница, 1998. 228–229.
- Вашенко, О.В., уклад. «Методичні вказівки до лабораторних робіт з технічної мікробіології .» Харків: НТУ «ХПІ», 2008.
- Воронін, Є.П., Пахлов, Є.М., Власова, Н.М., Сільченко, С.С., Головкова, Л.П., Чуйко, О.О. «Дослідження стабільності адсорбційних властивостей водних суспензій високодисперсного кремнезему по відношенню до альбуміну .» *Фармацевт.журнал*, 1999.

- Геращенко. «Мембранотропні властивості нанорозмірного кремнезему.» *Поверхность*, 2009: 288-306.
- Геращенко, І. І., Гунько, В. М., Ніцак, О. В. «Порівняння мембранотропних властивостей силіксу й ентеросгелю.» *Мед. хімія*, 2009: 25-29.
- Горобець, С. В., Горобець, О. Ю. *Біоінформатика : методичні вказівки до лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія, спеціалізації «Молекулярна біотехнологія»*. Уклад. С. В., Горобець, О. Ю., Дарменко, Є. А., Булаєвська, М. О. Горобець. КПІ ім. Ігоря Сікорського. Київ, 2017.
- Гужвинська, С. О. «Удосконалення технології культивування виробничих штамів *L. plantarum* та *B. adolescentis*, *Streptococcus lactis* на різних ростових субстратах.» *Ветеринарна медицина*, 2011: 148-150.
- Гусейнов, М.М. «Энтеросорбция при острых кишечных инфекциях молодняка крупного рогатого скота.» *Ветеринарная медицина.*, 2012: 70-71.
- Девришов, Д.А., Гусейнов, М.М. «Доклинические испытания препарата «Полисорбин».» *Ветеринарная медицина*, 2013: 25-28.
- Зайцева, Н.В. , Землянова, М.А., Звездин, В.Н., Довбыш, А.А., Гмошинский, И.В., Хотимченко, С. А., Сафенкова, И.В. «Токсикологическая оценка наноструктурного диоксида кремния. Параметры острой токсичности.» *Вопросы питания*, 2014: 42-49.
- Исаева, В.В, Каретин, Ю. А., Чернышев, А. В., Шкуратов, Д. Ю. *Фракталы и хаос в биологическом морфогенезе*. Владивосток: Институт биологии моря ДВО РАН, 2004.
- Косой, В.Д., Дунченко, Н.И. Меркулов, М.О. *Реология молочных продуктов: теория, научные исследования.* Москва: ДеЛи принт, 2010.

- Лисичкин, Г. В., ред. *Химия привитых поверхностных соединений*. Москва: Физматлит, 2003.
- Луцюк, Н. Б., Пентюк, А. А., Чуйко, Н. А. «Возможные механизмы терапевтического действия высокодисперсного кремнезема.» *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния*, 2003: 361-371.
- Макара, В. А., Стебленко, Л. П., Коротченков, О. О., Надточій, А. Б., Калініченко, Д. В., Курилюк, А. М., Науменко, С. М. «Особенности магнитостимульованої зміни поверхневого електричного потенціалу в кристалах кремнію, що використовуються для потреб сонячної енергетики та мікроелектроніки.» *Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології*, 2014: 247-258.
- Макара, В. А., та ін. «Зміна наноструктури та фізичних властивостей монокристалічного кремнію під дією слабкого магнітного поля.» *Наноструктурное материаловедение*, 2009: 3-9.
- Пентюк, О.О., Чуйко, О.О., Трахтенберг, І.М. «Проблеми токсичності кристалічних та аморфних форм кремнезему. Механізми взаємодії частинок кремнезему з клітиною.» *Совр. проблемы токсикологии*, 2004: 4-16.
- Потемська, О.І., Кігель, Н.Г., Даниленко, С.Г., Копилова, К.В., Закревська, В.М. «ВІДБІР МОЛОЧНОКИСЛИХ БАКТЕРІЙ ЗА РЕОЛОГІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ.» *Продовольчі ресурси*, 2016: 92-99.
- Рибак, О.М. «ЗАГАЛЬНІ ТЕХНОЛОГІЇ ХАРЧОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ Розділ «Технології молока і молочних продуктів».» *МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ до виконання лабораторних робіт для студентів напряму підготовки 6.051701. «Харчові технології та інженерія» денної і заочної форм навчання. ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ПУЛЮЯ*, 2014.

Скоропадська, С. В. «АНАЛІЗ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ КИСЛОТНОСТІ ПАСТЕРИЗОВАНОГО МОЛОКА.» 2014.

Скорченко, Т. А., Кравцова, О. В. « Дослідження впливу виду та дози сухих молочних продуктів на консистенцію кисломолочного напою.» *Молочна промисловість*, 2007.

Старовойтова, С.О. «Сучасні аспекти технології іммобілізованих пробіотиків.» *Biotechnologia Acta*, 2012: 9-20.

Стебленко, Л., Кордубан, О., Коплак, О., Демченко, П. «Магнітостимульовані процеси окиснення n-Si.» *Вісник Львівського університету. Серія фізична*, 2010: 49-54.

Ушакова, Н. А., Некрасов, Р. В., Правдин, В. Г., Кравцова, З.Л., Бобровская, О.И., Павлов, Д.С. «Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения.» *Фундаментальные исследования*, 2012: 184 – 192.

Чорна, Н. О., Чорна, Ю. В., Саленко, Т. В. «Застосування ентеросорбенту силікс при лікуванні гострих кишкових інфекцій.» *Проблеми військової охорони здоров'я*, 2016: 267-269.

Чуйко, А.А., ред. *Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния*. Київ: Наукова думка, 2003.